THÈSES

PRÉSENTÉES A

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR EN PHARMACIE

(DOCTORAT D'ÉTAT)

PAR

Jean-Pierre DUPIN

PHARMACIEN

Licencié ès Sciences Physiques (mention Chimie)

Docteur en Physico-chimie Structurale

Diplômé de l'Institut d'Administration des Entreprises (CAAE)

MAITRE-ASSISTANT A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

Première thèse :

SYNTHÈSES DE QUELQUES ε-AMINOACIDES
RECHERCHE ET DÉTERMINATION DE LEUR ACTIVITÉ ANTIFIBRINOLYTIQUE

Deuxième thèse :

NOTIONS DE « DURETÉ » ET DE « MOLLESSE » APPLIQUÉES AUX RÉACTIFS ORGANIQUES

Soutenues le 6 septembre 1974, devant la Commission d'Examen :

MM. P. MESNARD, Professeur à l'Université de Bordeaux II ..... *Président.*

F. MÉTRAS, Doyen de la Faculté des Sciences Exactes de l'Université de Pau

R. GOLSE, Professeur à l'Université de Bordeaux II ..... *Examinateurs*

R. CROCKETT, Professeur à l'Université de Bordeaux II .....

M. BOISSEAU, Maître de Conférences Agrégé à l'Université de Bordeaux II ..

N° d'ordre : 6

1974

THÈSES

PRÉSENTÉES A

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR EN PHARMACIE

(DOCTORAT D'ÉTAT)

PAR

Jean-Pierre DUPIN

PHARMACIEN

Licencié ès Sciences Physiques (mention Chimie)

Docteur en Physico-chimie Structurale

Diplômé de l'Institut d'Administration des Entreprises (CAAE)

MAITRE-ASSISTANT A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

Première thèse :

SYNTHÈSES DE QUELQUES ε-AMINOACIDES
RECHERCHE ET DÉTERMINATION DE LEUR ACTIVITÉ ANTIFIBRINOLYTIQUE

Deuxième thèse :

NOTIONS DE « DURETÉ » ET DE « MOLLESSE » APPLIQUÉES AUX RÉACTIFS ORGANIQUES

Soutenues le 6 septembre 1974, devant la Commission d'Examen :

MM. P. MESNARD, Professeur à l'Université de Bordeaux II ..... ***Président.***

F. MÉTRAS, Doyen de la Faculté des Sciences Exactes de l'Université de Pau
R. GOLSE, Professeur à l'Université de Bordeaux II .....
R. CROCKETT, Professeur à l'Université de Bordeaux II ..... *Examinateurs*
M. BOISSEAU, Maître de Conférences Agrégé à l'Université de Bordeaux II ..

N° d'ordre : 6

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

à SOLANGE, ma femme,
pour son intelligente compréhension.

à MARIE-LAURE et PIERRE-ARNAUD, nos enfants,
pour leur présence.

De toute la force de mon amour.

à la mémoire de mon PERE,
à ma MERE,
pour l'exemple qu'ils me lèguent.

En témoignage de ma reconnaissante affection.

à tous ceux qui me sont CHERS,
d'affection ou d'amitié,
pour l'aide de leur compagnie sur le chemin de chaque jour.

Avec l'assurance de la fidélité de mes sentiments.

A MES JUGES

Monsieur M. BOISSEAU
Maître de conférences Agrégé d'Immunologie,
Hématologie et Maladies du Sang
à l'Université de Bordeaux II
Médecin Biologiste des Hôpitaux
Ancien Interne des Hôpitaux

Je tiens à vous remercier tout particulièrement de m'avoir toujours manifesté beaucoup de sympathie et apporté avec grande amabilité l'aide de conseils précieux pour l'exécution de la partie biologique de ce travail.
Votre présence à mon Jury de Thèse est un honneur pour moi car vous êtes particulièrement compétent pour juger les résultats obtenus dans le domaine de la fibrinolyse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur R. CROCKETT
Professeur de Biochimie Pharmaceutique
à l'Université de Bordeaux II
Attaché des Hôpitaux
Ancien Interne, Médaille d'or des
Hôpitaux de Bordeaux
Chevalier des Palmes Académiques

Vous m'avez vivement engagé à orienter ma carrière vers les Sciences Pharmaceutiques ; vous avez suivi le cours de cette évolution en m'aidant de vos conseils et en m'encourageant par les marques d'intérêt que vous n'avez cessé de me manifester. Je vous dois d'avoir eu accès au monde hospitalier et en particulier à l'Unité U 8 INSERM de Cardiologie où j'ai pu effectuer une partie de ce travail.
Vous me faites l'honneur de siéger dans mon Jury de Thèse et je suis heureux de vous témoigner ma respectueuse et fidèle reconnaissance.

Monsieur le Professeur R. GOLSE
Professeur de Chimie Générale et Minérale
à l'Université de Bordeaux II
Pharmacien des Hôpitaux
Docteur ès-Sciences Physiques
Officier des Palmes Académiques

Vous avez encouragé et aidé ce travail de vos conseils. En me faisant l'honneur de participer à mon Jury de Thèse vous me donnez une marque de plus de votre bienveillante attention. Qu'il me soit permis de vous exprimer ma reconnaissance et mon respectueux attachement.

Monsieur le Doyen F. METRAS
Professeur de Chimie Organique
Doyen de la Faculté des Sciences Exactes
de l'Université de Pau
Ingénieur Chimiste

Vous me faites le grand plaisir de venir de Pau pour participer à mon Jury de Thèse. Lorsque vous étiez encore bordelais, en collaborant à vos travaux, j'avais pu bénéficier de vos conseils dans le domaine de la Chimie Organique et retenir des leçons de l'énergie déterminée et efficace que vous apportez à toute entreprise de Recherche. Votre présence est un honneur puisque vous acceptez de juger avec compétence mon travail de chimiste organicien devenu pharmacien, mais aussi une marque nouvelle de votre bienveillante sympathie. Je vous remercie bien sincèrement en vous assurant de ma fidèle amitié.

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur P. MESNARD
Professeur de Chimie Organique
et de Contrôle Physico-chimique des Médicaments
à l'Université de Bordeaux II
Docteur ès-Sciences Physiques
Docteur en Médecine
Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie
Membre correspondant de la Real Academia de Farmacia
de Madrid et de Barcelone
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre du Mérite
Officier des Palmes Académiques
Chevalier de la Santé Publique
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine

Pour exprimer tout ce que je vous dois, qu'il me soit tout d'abord permis de rappeler que je vous avais sollicité de me confier la charge d'un poste d'Assistant dans votre Service, en étant animé par l'aspiration profonde de voir ma carrière de chimiste s'orienter vers des fonctions d'enseignement et vers des activités de recherche dans le domaine de la Chimie des Médicaments.

Il m'est alors facile de dire toute la sincérité de ma profonde gratitude à votre égard, puisque vous avez bien voulu m'accueillir dans votre Laboratoire et être mon Maître dans ces deux orientations en me faisant bénéficier de vos conseils de pédagogue et en dirigeant ce travail de Recherche jusqu'à sa présentation devant ce Jury que vous présidez.

Je voudrais aussi rendre témoignage des joies que je connais à travers les marques de confiance que vous me donnez et vous exprimer ma profonde reconnaissance pour l'enrichissement que je dois à la collaboration à laquelle vous voulez bien m'appeler.

Qu'il me soit permis de vous assurer de mes sentiments de très respectueux et fidèle attachement.

A mes Maîtres et à mes Amis

de l'Université de Bordeaux II

M. le Président H. BRICAUD m'a autorisé à effectuer une partie de ce travail dans le Laboratoire U 8 INSERM qu'il dirige. Je tiens à lui exprimer toute ma respectueuse reconnaissance pour l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé ainsi que pour les témoignages d'intérêt qu'il m'a manifestés. Dans son Service, mes remerciements vont aussi à Mlle S. MAURIN Surveillante, et à Mme E. MULLER et M. J.P. MANUO sans oublier M.C. LADRECH.

Mme le Professeur S. LARCEBEAU, avec grande gentillesse, a bien voulu accepter que l'essai de tolérance de certains produits soit effectué dans son Laboratoire. Je lui exprime ma gratitude et l'assurance de mes très respectueux sentiments. Que Mlle M. ANDRIEUX soit également remerciée.

M. le Professeur G. DEVAUX, en acceptant d'être membre du Comité de Lecture de cette Thèse, me manifeste une fois de plus sa bienveillante attention. Je tiens à lui dire ici ma reconnaissance respectueuse.

M. le Professeur Agrégé D. DUCASSOU a mis à ma disposition les produits marqués et m'a permis d'effectuer les mesures de radioactivité. A la spontanéité de son aide il a ajouté de nombreuses et très enrichissantes discussions que je souhaiterais pouvoir poursuivre au delà de ce travail s'il le veut bien. Il a accepté d'être membre du Comité de Lecture de cette Thèse ; pour tous ses encouragements et pour cette nouvelle marque de sa sympathie, je lui exprime ma respectueuse gratitude.

M. le Docteur R. BRASINGTON s'est intéressé avec compétence et à contribué avec efficacité à une partie de ces recherches. Qu'il en soit ici remercié et qu'il veuille croire à mes sentiments de réelle amitié.

Je veux aussi citer ici tous mes amis du Laboratoire de M. le Professeur P. MESNARD qui resteront dans mon souvenir liés à la période d'élaboration de ce travail puisque, pendant le même temps, ils m'auront apporté, soit leur collaboration dans l'enseignement des Travaux Pratiques, M. J.P. POMETAN et Mlle B. ARREGUY, soit leur collaboration technique, M. B. SAN MIGUEL, soit les marques de leur sympathie confraternelle, M. C. RENAUDIE, Melles F. MONTEIL et M. LECOMTE, Mme JOSEPH-CHARLES et M. F. NAMIGOHAR ; et je n'oublie pas non plus le dévouement de Mmes C. GUILLABERT et A. LOPEZ. A chacun je dis ma très sincère amitié.

A mes Maîtres et à mes Amis

de l'Université de Bordeaux I

Les premières années de ma formation ont au pour cadre la Faculté des Sciences de l'Université de Bordeaux. Mon sentiment de reconnaissance va tout naturellement à ceux qui ont eu pour charge de m'initier à la Chimie et je m'adresse avec joie à ceux qui ont été mes Maîtres ou qui sont mes Amis.

Tout d'abord je veux rappeler que c'est dans le Laboratoire de M. le Doyen R. CALAS que j'ai fait mes débuts de chimiste organicien. Il m'avait accueilli comme élève et, il y a dix ans exactement, me faisait soutenir ma Thèse de Docteur en Physico-chimie Structurale. Depuis, en plusieurs circonstances, il m'a donné des témoignages de sa bienveillante attention ; plus récemment, au cours de ce travail, il m'a permis l'accès à certains secteurs de son Laboratoire. Je tiens à lui exprimer aujourd'hui mes sentiments de fidèle et respectueuse reconnaissance.

Je ne peux oublier non plus tout ce que ma formation doit aux années que j'ai passées comme Ingénieur de Recherche du C.N.R.S. dans le Service de M. le Doyen J. VALADE ; qu'il soit assuré de tout mon respect.

Au cours de ce travail, M. le Professeur R. LALANDE a bien voulu, à plusieurs reprises, m'accueillir dans son Service. Je l'en remercie respectueusement.

Par son exemple, M. N. DUFFAUT a surement une part de "responsabilité" dans mon orientation vers la Chimie des Médicaments. Il m'est agréable de lui témoigner aujourd'hui mon amical et respectueux souvenir.

M. J. DUNOGUES m'a souvent apporté l'aide de ses profondes qualités humaines et scientifiques. Je le remercie de m'accorder son enrichissante amitié. M. P. BOURGEOIS m'a aussi aidé de son amitié solide et de ses qualités discrètes et désintéressées. Que tous deux trouvent ici l'expression de mes sentiments d'amicale gratitude.

Je ne veux non plus passer sous silence les témoignages de sympathie que j'ai rencontrés auprès de divers spécialistes auxquels j'ai pu faire appel, Mlles A. BELLOCQ et M. CAZENAVE et MM. G. BOURGEOIS et M. PETRAUD. Je les en remercie amicalement.

SYNTHESE DE QUELQUES ε-AMINOACIDES

RECHERCHE ET DETERMINATION DE LEUR ACTIVITE ANTIFIBRINOLYTIQUE

INTRODUCTION

De multiples syndromes hémorragiques ont pour origine une augmentation de l'activité antifibrinolytique du sang. Depuis une dizaine d'années on dispose, à côté d'inhibiteurs d'origine naturelle, d'inhibiteurs de synthèse qui permettent de combattre efficacement l'hyperfibrinolyse.

De nombreux travaux ont été effectués sur ce sujet ; cependant la connaissance du mécanisme de l'inhibition reste très incomplète et si plusieurs molécules se sont révélées douées de propriétés antifibrinolytiques, deux seulement, l'acide ε aminocaproïque et l'acide trans para aminométhyl cyclohexane carboxylique, ont été retenus pour un usage thérapeutique.

Nous avons abordé ce domaine dans l'intention de rechercher, avec le secours des possibilités de la Chimie Organique, quelques compléments aux connaissances actuelles sur le phénomène de l'inhibition de la fibrinolyse et sur les inhibiteurs de synthèse.

Après un rappel de nos connaissances sur la fibrinolyse et une étude préalable des séries auxquelles appartiennent les inhibiteurs synthétiques, nous avons porté notre choix sur des composés qui nous paraissaient intéressants. Si quelques uns sont fournis couramment dans le commerce, la plupart doivent

être préparés au laboratoire, certains à notre connaissance, pour la première fois.

L'appréciation de l'efficacité de ces molécules présente le double aspect d'une recherche rapide des propriétés antifibrinolytiques, dont le résultat peut orienter éventuellement la poursuite du travail de synthèse, et d'une détermination plus précise du pouvoir antifibrinolytique permettant une comparaison avec les composés connus.

L'exposé de notre travail comporte trois parties :

première partie : La Fibrinolyse et son inhibition par les agents de synthèse.

deuxième partie : Les inhibiteurs synthétiques de la fibrinolyse. Synthèse de quelques ε aminoacides susceptibles de présenter une activité antifibrinolytique.

troisième partie : Recherche et détermination du pouvoir antifibrinolytique des composés synthétiques. Résultats et discussions.

PREMIERE PARTIE

LA FIBRINOLYSE
ET SON INHIBITION PAR DES INHIBITEURS
DE SYNTHESE.

Notre travail se situe dans le domaine de l'inhibition de la fibrinolyse par des agents de synthèse. Il nous est tout d'abord nécessaire de replacer ce domaine dans un cadre plus général, en rappelant sommairement les connaissances actuelles sur le phénomène de la fibrinolyse.

LA FIBRINOLYSE

ET SON INHIBITION PAR LES AGENTS DE SYNTHESE

On entend par "fibrinolyse" le processus enzymatique qui aboutit à la destruction du réseau de fibrine constituant le caillot sanguin.

HISTORIQUE

La fibrinolyse a été observée dès le XVIII siècle (1, 2, 3). Elle a été définie en 1893 par A. DASTRE dans les termes suivants :
"La fibrine laissée en contact avec son sang générateur y disparaît dans des proportions souvent considérables (3 à 44 %). C'est cette disparition que je nomme fibrinolyse" (4).

De nombreux travaux se rapportèrent alors à l'induction de la fibrinolyse in vivo (5, 6) et in vitro (7, 8), puis en 1933, W. S. TILLET et col. (9) découvrirent le pouvoir activateur de la fibrinolyse, d'une substance provenant de la culture de

certains streptocoques hémolytiques : "la streptokinase".

La nature enzymatique du phénomène fut mise en évidence en 1945 par L.R. CHRISTENSEN et col. (10) qui définirent les termes de "plasminogène" et "plasmine".

En 1956 T. ASTRUP (11) avança la notion d'équilibre entre les deux systèmes sanguins de la coagulation et de la fibrinolyse pour lesquels existent de grandes analogies (Fig. 1 et 2) (12).

Depuis, l'intérêt pour la fibrinolyse n'a cessé de croître et a suscité de très nombreux travaux : en 1972, F. MARKWARDT et col. (209) recensent 2063 références.

Nous rappelons ici les résultats obtenus dans l'étude du phénomène de la fibrinolyse.

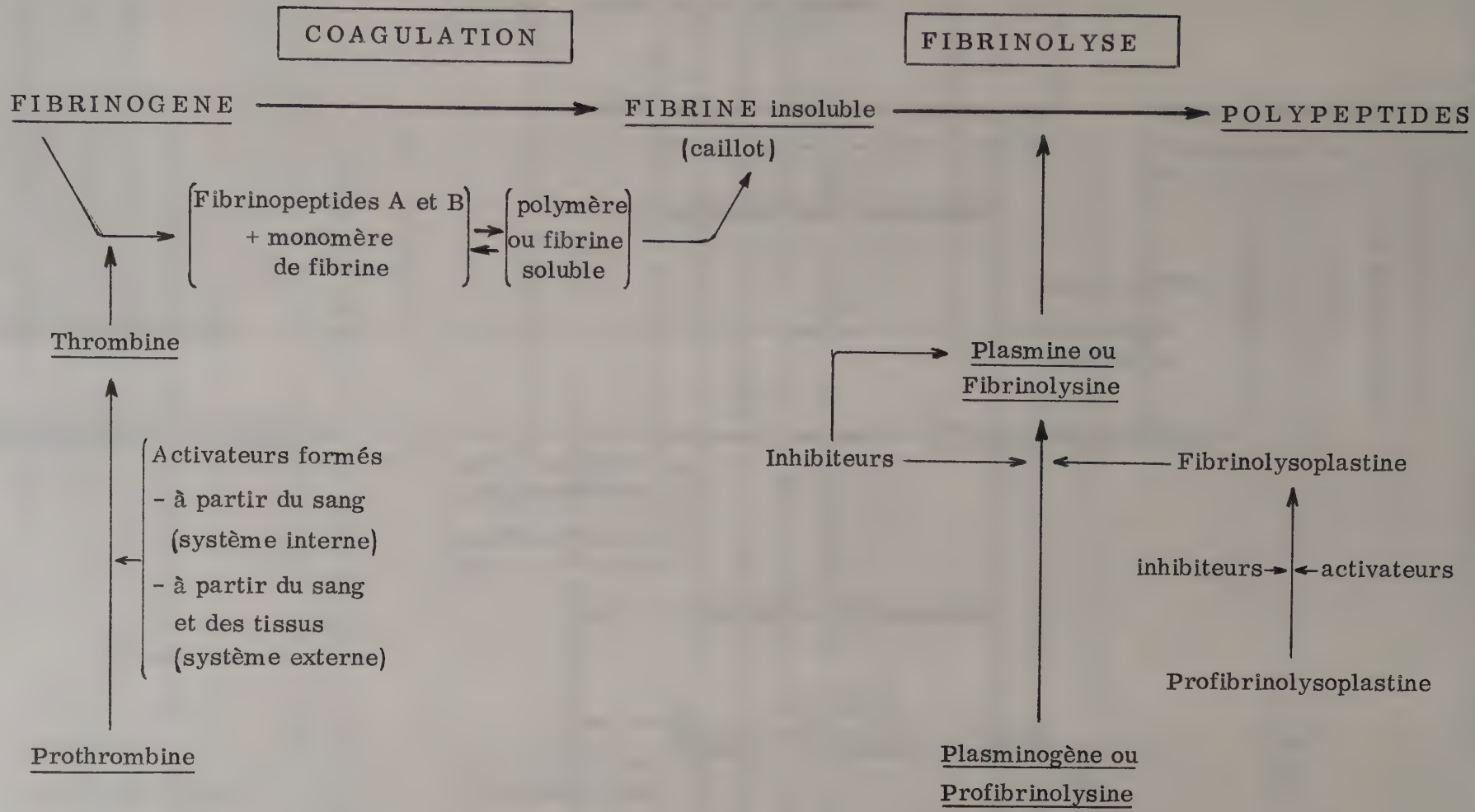


figure 1 - Schéma des systèmes de coagulation et de fibrinolyse

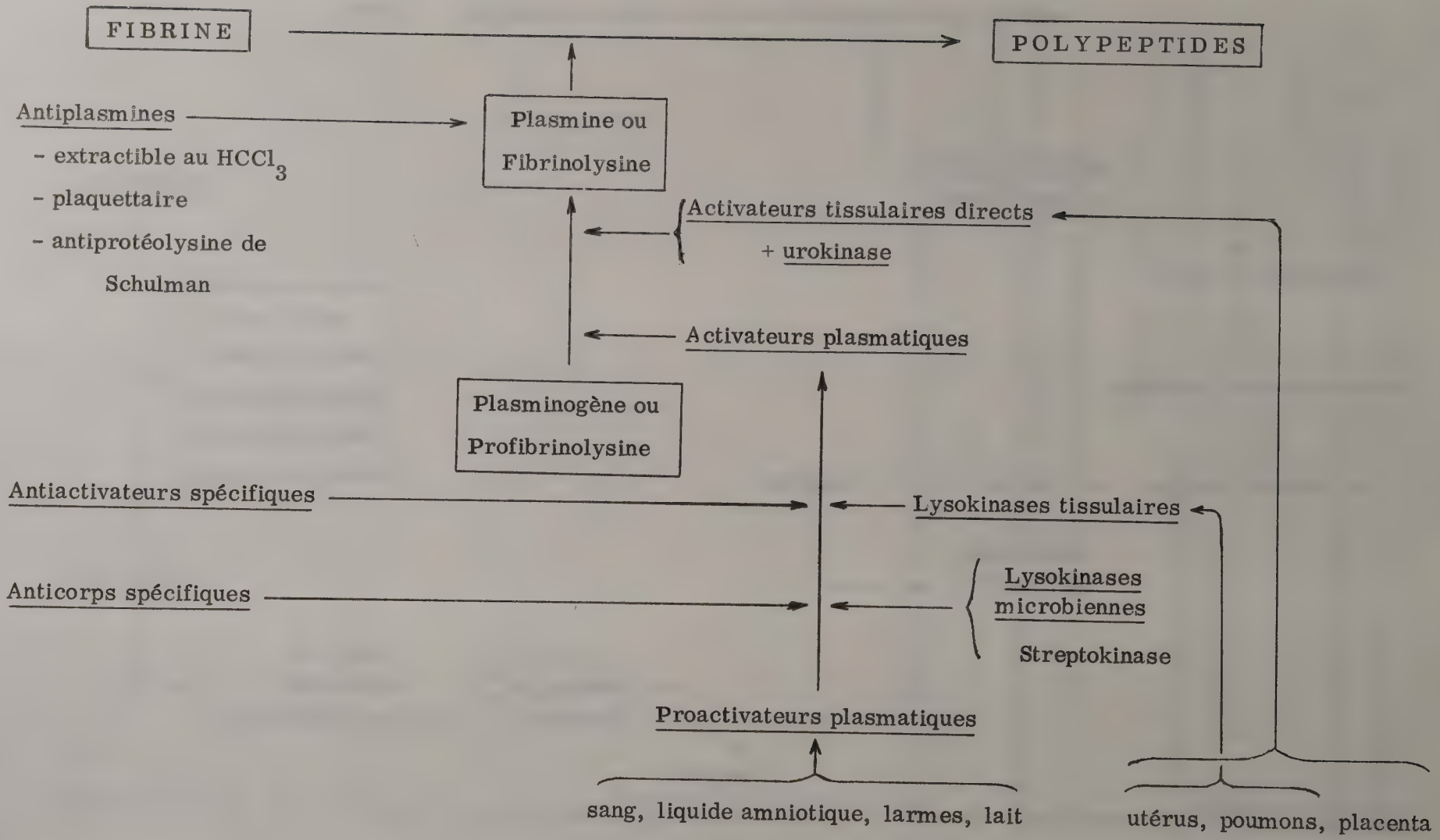


figure 2 - Schéma de la fibrinolyse

I - LES ELEMENTS DU SYSTEME PLASMINOGENE-PLASMINE

Ce système comprend :

- le plasminogène
- la plasmine
- les activateurs de la transformation plasminogène-plasmine
- les inhibiteurs de la fibrinolyse.

1° - Le plasminogène (fig. 3)

Le plasminogène est une enzyme dont on a évalué le poids moléculaire aux environs de 140 000 (13) ou 80 000 (14) car les méthodes de préparation, même suivies des purifications les plus soigneuses, ne permettent pas d'obtenir un plasminogène parfaitement homogène.

Le plasminogène a été extrait par précipitation de la fraction COHN III du plasma en employant un acide minéral fort (15), mais un tel traitement entraîne vraisemblablement divers changements dans sa molécule qui se traduisent par les variations de son poids moléculaire et de sa solubilité qui est quasi nulle. Plus récemment, par chromatographie, il a été possible (16, 17) de préparer du plasminogène entièrement soluble en milieu neutre.

Dans le sérum ou dans le plasma, le plasminogène est stable sur de larges gammes de température et de pH (18).

2° - La plasmine (fig. 3)

La plasmine est aussi une enzyme ; elle est issue de l'activation du plasminogène (19, 20) ; selon les méthodes d'activation, on prépare différents types de plasmine (21, 22, 23).

La plasmine a une activité protéolytique qui s'exerce en particulier, aussi bien vis à vis du fibrinogène que vis à vis de la fibrine. En milieu plasmatique, c'est-à-dire en présence d'inhibiteurs naturels, l'activité de la plasmine est spécifiquement orientée vers la fibrine (24).

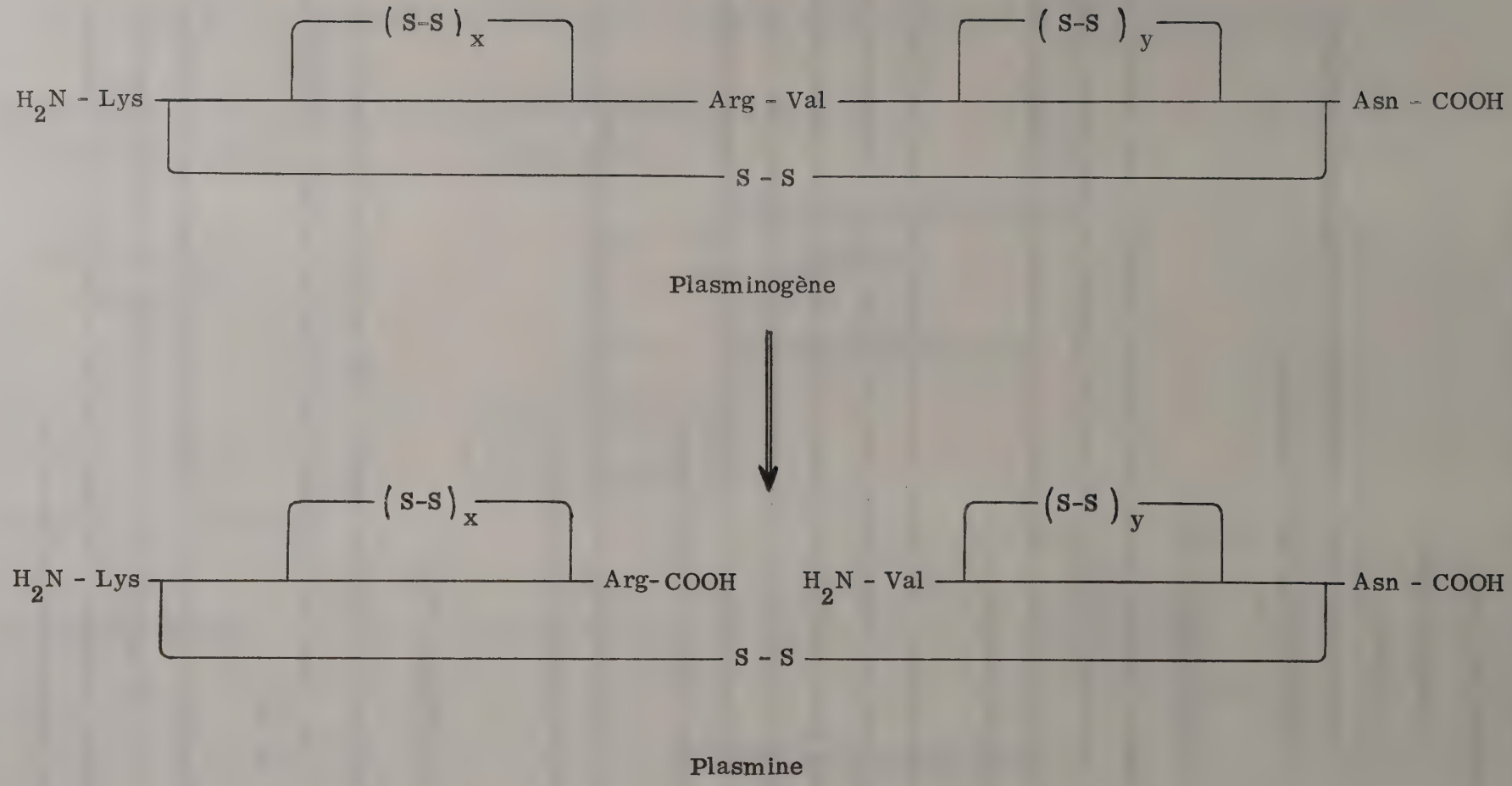


figure 3 - Schéma de l'activation par l'urokinase du plasminogène en plasmine

D'autres protéines sont aussi lysées par la plasmine : la prothrombine, le facteur V (25), la globuline antihémophylique (26), le glucagon, l'ACTH, l'hormone de croissance (27) ainsi que certains composants du complément (28).

3° - Les activateurs de la transformation plasminogène-plasmine

a) Activation du plasminogène (fig. 3)

L'activation du plasminogène, c'est-à-dire sa transformation en plasmine, est un phénomène protéolytique, dont le processus est analogue à celui de la formation d'autres enzymes protéolytiques, telles que la trypsine ou la thrombine. Cette activation présente les caractères suivants :

- c'est une réaction enzymatique qui provoque la rupture d'un certain type de liaisons peptidiques et qui est irréversible.

- les activateurs du plasminogène possèdent la propriété de lyser les esters de la lysine et de l'arginine, ce qui laisse supposer que des liaisons faisant intervenir ces deux aminoacides sont lysées au cours du processus d'activation.

- diverses méthodes d'activation on fait penser que le phénomène entraînait une diminution du poids moléculaire mais pour K. C. ROBBINS (20), l'activation résulte seulement de la rupture d'une liaison arginyl-valine.

b) Les activateurs du plasminogène

Des activateurs du plasminogène existent dans l'organisme au niveau du plasma et au niveau des tissus, mais on a trouvé aussi des substances activatrices dans l'urine. Certains milieux de culture bactérienne fournissent également des substances qui possèdent la propriété d'activer la transformation plasminogène-plasmine.

Selon leur mode d'action on peut distinguer trois types d'activateurs :
- des activateurs spécifiques tels que l'urokinase
- des enzymes protéolytiques non spécifiques, telles que la trypsine et la plasmine
- des substances susceptibles de rendre actif un proactivateur qui, sans elles resterait inactif, telles que la streptokinase ou les lysokinases tissulaires.

En fonction de leur origine, on peut distinguer les activateurs

- plasmatiques
- tissulaires
- urinaires
- bactériens.

1 - activateurs plasmatiques

Dans le plasma normal, les activateurs figurent à l'état de traces, mais ils existent en plus grande quantité après un exercice physique, une émotion, une intervention chirurgicale ou d'autres phénomènes traumatisants (29).

In vitro, ces activateurs plasmatiques sont extrêmement labiles et difficiles à mettre en évidence ; leur origine n'est pas connue avec précision, mais pour au moins une partie, ils proviennent de la paroi veineuse (30, 31).

2 - activateurs tissulaires

La plupart des tissus contiennent à la fois

- un activateur immédiatement soluble (32)
- un activateur beaucoup moins soluble (33), que l'on retrouve dans les cultures de tissus, ce qui fait penser que sa synthèse a lieu dans le tissu lui-même (34). Vraisemblablement, cet activateur est concentré dans les tissus au niveau des vaisseaux sanguins et en particulier des veines et veinules (35).

Pratiquement tous les tissus de l'organisme possèdent des propriétés activatrices, mais surtout la prostate, l'utérus, la thyroïde, les poumons, le coeur, les ovaires et les tissus lymphatiques (56). Les éléments figurés du sang ont aussi été découverts comme possédant des propriétés activatrices, aussi bien les cellules rouges (36, 37), que les leucocytes et même, mais d'une façon plus variable, les plaquettes (38).

Les liquides biologiques comme le lait (39) ou les larmes, la salive (32), renferment des activateurs du plasminogène.

3 - activateur urinaire

La présence d'une substance activatrice du plasminogène dans l'urine confère à cette dernière une activité spécifiquement fibrinolytique (40, 41, 42) ; on lui donne le nom d' "urokinase", elle est présente à des concentrations

identiques dans l'urine éliminée et dans l'urine obtenue par ponction rénale (43).

C'est une enzyme protéolytique, stable dans un large domaine de température et de pH, dont le poids moléculaire est de l'ordre de 54 000 (44, 45). Son origine n'est pas encore bien connue ; trois hypothèses ont été avancées pour expliquer sa formation :

- rupture de cellules épithéliales du tractus urinaire (46)
- sécrétion active du rein (47)
- excrétion par le rein d'un activateur élaboré dans une autre région de l'organisme (48).

Il semble toutefois bien établi que l'urokinase soit un activateur différent des autres activateurs trouvés dans l'organisme (49). Son rôle physiologique serait d'assurer le maintient d'un bon tractus urinaire en provoquant la lyse des dépôts de fibrine qui pourraient se former (50).

4 - activateurs bactériens

De nombreux micro-organismes produisent des activateurs du plasminogène. Le plus actif est produit par les streptocoques, on lui a donné le nom de "streptokinase". C'est une protéine de poids moléculaire d'environ 43 000 (51) que l'on prépare actuellement à partir du streptocoque CH 46a ; elle montre une spécificité marquée pour le plasminogène humain, qui est rapidement activé, alors que les plasminogènes de lapin et de chien le sont plus difficilement et que le plasminogène bovin reste inchangé (52).

La streptokinase a le pouvoir de provoquer la conversion du plasminogène en plasmine suivant une réaction en deux temps, c'est-à-dire en transformant tout d'abord un proactivateur du plasma en un activateur qui agit ensuite (53). La nature de ce proactivateur n'a pas encore été parfaitement élucidée : pour certains auteurs il s'agit du plasminogène lui-même (18), et pour d'autres de la plasmine (54).

Comme les autres protéines provenant des streptocoques, la streptokinase est un antigène pour l'organisme humain, et elle se trouve rapidement liée à son anticorps ; si donc on emploie la streptokinase en thérapeutique pour activer la fibrinolyse, il faut, pour que son action soit sensible, une quantité supérieure à celle qui correspond aux anticorps.

In vitro, l'addition au plasma de quantités croissantes de streptokinase entraîne progressivement une diminution du temps de lyse du caillot jusqu'à un minimum correspondant à une dose d'environ 1000 à 2000 U.I. par ml, puis, si la quantité de streptokinase continue à croître, le temps de lyse augmente à nouveau progressivement. Cela pourrait être expliqué par une liaison de la streptokinase avec le plasminogène ou la plasmine, ce qui entraînerait un défaut de l'enzyme protéolytique (56).

5 - autres activateurs

Le plasminogène peut aussi être activé par la trypsine et par la plasmine elle même (21).

Le facteur de Hageman semble aussi intervenir, puisque au contact de surfaces capables de l'activer, la fibrinolyse est aussi activée ; par ailleurs ce phénomène n'est pas observable avec du plasma présentant un défaut de facteur Hageman (57).

D'autres substances non enzymatiques ont aussi manifesté des propriétés activatrices de la fibrinolyse, mais seulement lors d'une administration in vivo car aucun effet n'est décelable in vitro. C'est par exemple le cas d'hormones (58) ou de composés connus par ailleurs pour leur activité vasculaire comme l'adrénaline, la vasopressine ou l'acétylcholine (59, 60).

4° - Les inhibiteurs de la fibrinolyse

Les activateurs du système plasminogène-plasmine, qu'ils soient de type spécifique ou non spécifique et qu'ils agissent par l'intermédiaire d'un proactivateur ou directement, ont tous leur action orientée vers le plasminogène.

Par contre les inhibiteurs peuvent agir, soit au niveau du plasminogène en empêchant son activation (type anti-activateur), soit au niveau de la plasmine déjà formée (type anti-plasmine). Pour certains, le type d'action paraît bien établi, alors que pour d'autres, le rôle est encore discuté.

a) Antiactivateurs du plasminogène

1 - antiactivateur plasmatique

Il semble bien admis que le plasma normal possède une activité antiactivatrice (61, 13, 62), due à un antiactivateur plasmatique capable d'inhiber l'activité fibrinolytique de la streptokinase. Il semble aussi que cet inhibiteur naturel de type antistreptokinase est distinct des anticorps qui apparaissent à la suite d'une injection de streptokinase (63).

2 - antiactivateur tissulaire

L'hypothèse de l'existence d'un antiactivateur présent dans différents tissus et en particulier dans le cœur et les poumons a été confirmée dans le cas d'un inhibiteur spécifique de l'urokinase observé dans le placenta (64).

3 - autres antiactivateurs

Des antiactivateurs du plasminogène, d'origine non humaine, ont été mis en évidence :

- ils peuvent être d'origine naturelle, comme l'aprotinine, mieux connue sous le nom de "Trasylol" ; c'est un polypeptide, isolé à l'origine à partir de la glande parotide de bœuf et préparé actuellement à partir des poumons de bœuf. Le Trasylol est un inhibiteur énergique de l'activation du plasminogène (65).
- ils peuvent être préparés par synthèse, comme certains acides aminés sur lesquels nous reviendrons plus loin.

b) Les antiplasmines

Le sang renferme des inhibiteurs de la plasmine qui ont fait l'objet de nombreux travaux. Les résultats cependant sont parfois en désaccord sur certains points, tels que la nature de ces inhibiteurs et leur nombre :

- certains auteurs ont supposé un facteur antiplasminique contenu dans les pseudo-globulines sériques (66) ou dans le surnageant d'un précipité d'euglobulines (67).
- pour d'autres, il y aurait dans le sang deux inhibiteurs de la plasmine (68) :
  . le premier à réaction rapide et réversible en présence de substrat protéique contenu dans les α_2 globulines

. le second à action lente et peu reversible en présence de substrat protéique contenu dans les α_1 globulines.

- d'après d'autres auteurs ces deux inhibiteurs seraient contenus dans les β_2 et β_1 globulines (69) ou les β lipoprotéines (70) ou même les macroglobulines (13).

Tant de divergences ne peuvent correspondre à autant d'inexactitudes et il faut plutôt admettre (63) qu'il existe plusieurs types d'antiprotéines sériques, chacun étant essentiellement inhibiteur d'une protéase, mais présentant aussi des affinités différentes pour les autres enzymes protéolytiques. Cette interprétation explique en particulier la complexité des résultats obtenus.

D'autres substances d'origine non humaine ont manifesté une activité antifibrinolytique qui semblerait due à des propriétés antiplasminiques ; c'est le cas de certains inhibiteurs naturels.

c) Les autres inhibiteurs de la fibrinolyse

D'autres facteurs, dont le rôle exact au niveau du système plasminogène-plasmine est encore discuté, ont une action globale qui s'oppose à la fibrinolyse.

- Les lipides ont un rôle qui reste très confus bien qu'on ait observé des corrélations entre l'inhibition de la fibrinolyse et les variations de divers paramètres lipidiques tels que les lipoprotéines, les β lipoprotéines, les acides gras saturés, les triglycérides et le cholestérol (71).

- Le calcium semble aussi avoir une action (72).

- Les éléments figurés du sang jouent également un rôle :

. certains auteurs (73, 74) attribuent une grande importance à une antiplasmine plaquettaire qu'ils supposent être différente de l'antiplasmine sérique.

. pour d'autres auteurs (75, 76) par contre, le rôle de l'antiplasmine plaquettaire ne serait que très secondaire.

II - LE MECANISME DE L'ACTIVATION DU PLASMINOGENE

1° - Hypothèse de S. SHERRY

S. SHERRY et ses collaborateurs (77) ont proposé le concept de l'activation du plasminogène à la fois

- sous sa forme soluble dans le plasma
- sous sa forme de gel dans le caillot.

Dans le plasma d'une part, l'activation du plasminogène soluble n'est pas très rapide et la plasmine reste sans effet sur les substrats plasmatiques et en particulier la fibrine, car l'antiplasmine du plasma l'inhibe rapidement au fur et à mesure de sa formation. Toutefois l'activation peut être plus rapide et dépasser temporairement le mécanisme d'action de l'antiplasmine, entraînant l'existence de plasmine libre dans la circulation, ce qui provoque la digestion de certains substrats, y compris le fibrinogène et divers facteurs de la coagulation, et par suite des hémorragies.

Dans le caillot d'autre part, les inhibiteurs agissent beaucoup moins facilement sur le plasminogène et sur les activateurs ; dès l'activation, la plasmine lysera la fibrine qui est à son contact dans le caillot.

Selon cette hypothèse, le rôle principal du plasminogène serait de doter la fibrine qui peut se former dans les vaisseaux, du moyen d'assurer sa lyse ultérieure sous l'action des activateurs, absorbés lors de sa formation ou qui diffusent à partir du plasma. Cette théorie découle de certains résultats obtenus in vitro (78, 79), mais d'autres observations semblent appeler une interprétation modifiée des phénomènes, en particulier les travaux réalisés à partir de thrombus artificiels (75, 80, 81) montrent que la thrombolyse complète n'a pas lieu par simple perfusion d'activateur, mais nécessite la perfusion d'un milieu contenant aussi du plasminogène.

2° - Hypothèse de J.L. AMBRUS

Pour J.L. AMBRUS et ses collaborateurs (82, 83, 84), la plasmine existerait dans le plasma sous forme d'un complexe plasmine-antiplasmine au niveau duquel la fibrine vient, compétitivement et sur un site spécifique, prendre la place de l'antiplasmine. Toutefois, le support expérimental nécessaire pour étayer complètement cette hypothèse reste encore incomplet.

Ces deux théories éloignées qui tentent d'expliquer le même phénomène montrent que le mécanisme de la fibrinolyse in vivo est très complexe et l'on peut penser (56) qu'il tient compte à la fois des deux processus proposés respectivement par S. SHERRY et par J.L. AMBRUS.

III - LE ROLE BIOLOGIQUE DE LA FIBRINOLYSE

1° - Equilibre coagulation-fibrinolyse

Depuis longtemps il a été avancé (85) que la fibrinolyse et la coagulation constituent l'équilibre dynamique qui maintient intact l'arbre vasculaire. Dans cette hypothèse, le système de la coagulation serait constamment actif, produisant de la fibrine partout où elle serait nécessaire pour compenser une déficience de l'endothélium ; le système de la fibrinolyse serait aussi constamment actif, éliminant les dépôts de fibrine partout où serait terminée sa fonction hémostatique.

Si les systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse constituaient un équilibre absolu, une diminution de la coagulation par exemple devrait entraîner corrélativement une diminution de la fibrinolyse et inversement. Or cette réciprocité n'est pas toujours totale et il en résulte des variations physiologiques ou pathologiques de la fibrinolyse :

- l'hypofibrinolyse (qui revient à une hypercoagulation) et qui entraîne une thrombose
- l'hyperfibrinolyse qui entraîne une hémorragie.

Cependant si l'équilibre entre ces deux systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse n'est pas réalisé d'une façon complète, il est certain qu'ils agissent réciproquement à différents niveaux puisque par exemple :

- le facteur de Hageman active à la fois la coagulation et la fibrinolyse (57)
- la thrombine et la plasmine entrent en compétition vis à vis des α_2 macroglobulines qui pourraient aussi jouer un rôle essentiel dans l'équilibre (86)
- l'injection de thrombine chez l'animal provoque un démarrage du processus fibrinolytique (87)
- l'injection de streptokinase ou de thrombine provoque chez l'homme un raccourcissement du temps de recalcification (88).

2° - Variations physiologiques

a) L'exercice physique et le stress émotionnel

De nombreuses observations ont montré que l'augmentation de ces paramètres entraîne une augmentation de la fibrinolyse (29).

b) L'âge, le sexe, la race

La fibrinolyse semble augmenter avec l'âge et pour le même âge, elle est plus importante chez l'homme que chez la femme. Les différences raciales entraînent aussi des variations de l'activité fibrinolytique.

c) La grossesse

Diverses variations de la coagulation et de la fibrinolyse ont été notées au cours de la grossesse. Dans la période du post partum, on observe une réduction de l'activité fibrinolytique (89). Le retour à une activité fibrinolytique normale s'effectue entre 15 à 60 mn après la délivrance mais suivant un mécanisme inconnu (90). Cette diminution temporaire de la fibrinolyse assure une prévention de l'hémorragie que pourrait provoquer la séparation du placenta mais peut aussi être responsable de complications thromboemboliques qui surviennent parfois.

3° - Variations pathologiques

a) Diminution de l'activité fibrinolytique

1 - dans les affections rénales

On a constaté (91, 92) que dans de nombreux types d'affection rénale chronique, l'activité fibrinolytique est diminuée ; ce qui est en accord avec l'augmentation des globulines à effet antiplasmine ou avec la diminution de l'urokinase urinaire que l'on observe dans ces cas. La diminution au moins locale de la fibrinolyse, entraînant un dépot de fibrine, serait à l'origine de différents types de néphrites (93).

2 - dans les affections caractérisées par des phénomènes thrombotyques

La diminution de l'activité fibrinolytique a aussi été observée d'une façon générale dans le cas de malades chez qui venait de se développer un accident thrombotyque, tel qu'un début d'embolie pulmonaire (94) ou une thrombose veineuse (95).

Dans le cas d'infarctus du myocarde (96, 97) la diminution constatée correspond plutôt à un mécanisme de réponse à la lésion, qu'à sa cause.

b) Augmentation de l'activité fibrinolytique

L'équilibre du système coagulation-fibrinolyse peut être rompu avec augmentation pathologique de la fibrinolyse. Deux types de mécanismes peuvent en être l'origine et intervenir simultanément :
- un déficit primitif en inhibiteurs du système plasminogène-plasmine
- une activation accrue du plasminogène aboutissant à une formation exagérée de plasmine que les inhibiteurs de cette dernière sont insuffisants à neutraliser.

Quel que soit le processus, on observe alors un excès de plasmine libre dans la circulation : c'est l'hyperplasminémie. Elle est à l'origine de manifestations hémorragiques généralisées dont le mécanisme est le suivant : la plasmine, qui dans le cadre physiologique, agit spécifiquement sur la fibrine, peut, dans le cadre du dérèglement pathologique, détruire le fibrinogène ainsi que les facteurs V et VIII de la coagulation ; la fibrinogénopénie et le déficit des facteurs de coagulation sont alors responsables du syndrome hémorragique. De plus, les produits de dégradation du fibrinogène (P.D.F.), incorporés à la fibrine, entraînent, lors de la coagulation qui est retardée, un caillot défectueux qui sera d'autant plus facilement dégradé (98).

L'activation exagérée du plasminogène, qui est à l'origine de cette hyperfibrinolyse, se produit en particulier lorsque des tissus, riches en activateurs, sont endommagés :

- lors de gestes chirurgicaux (99) portant essentiellement sur des organes tels que l'utérus, la vessie, la prostate, les poumons
- lors d'opérations cardiaques avec circulation extracorporelle (100)
- lors de complications obstétricales, qu'il s'agisse d'hémorragies génitales fonctionnelles (101) ou en rapport avec une lésion organique de type néoplasique ou consécutive au décollement du placenta (102)
- lors du développement de tissus néoplasiques aux niveaux prostatique (103) ou pancréatique (104)
- enfin lors de très nombreuses affections diverses, cyrrhose hépatique (105) par exemple.

IV - CORRECTION PAR LA THERAPEUTIQUE DES VARIATIONS PATHOLOGIQUES

1° - Correction de l'hypofibrinolyse

Cette variation pathologique se manifeste, comme nous l'avons noté, par des thromboses ou des embolies.

Pour prévenir ces accidents on emploie des anticoagulants. Ceux-ci inhibent la coagulation du sang, soit directement et immédiatement, comme l'héparine et ses dérivés qui bloquent l'action de la thrombine, soit indirectement et avec un certain retard, comme les coumariniques, appelés aussi antivitamines K parce qu'ils s'opposent à la synthèse hépatique de la prothrombine. Mais ces substances restent impuissantes devant l'occlusion vasculaire provoquée par un caillot apparu, soit avant, soit même pendant et malgré le traitement anticoagulant.

Pour obtenir la guérison, c'est-à-dire pour lever une obstruction vasculaire déjà établie, il faut utiliser des agents médicamenteux susceptibles de déclancher la dissolution de la fibrine qui constitue la trame des caillots. Ces substances sont des fibrinolytiques ; le principal représentant en est la streptokinase dont les excellents résultats justifient une très large utilisation (106). Il est hors de notre propos de développer les connaissances actuelles relatives aux fibrinolytiques.

2° - Correction de l'hyperfibrinolyse

Nous avons déjà noté que cette variation pathologique se manifeste par un syndrome hémorragique généralisé (on parle d'hémorragies par fibrinolyse mais il vaudrait mieux dire par fibrinogénolyse, puisque c'est la destruction du fibrinogène qui en est essentiellement la cause).

Le traitement, en dehors de diverses mesures ayant pour but de restaurer la masse sanguine et de compenser le déficit en fibrinogène, peut être envisagé grâce aux antifibrinolytiques, qui peuvent être classés selon deux types bien différents :

-- les inhibiteurs d'origine naturelle, qui sont essentiellement des antiplasmines. Ils agissent en se combinant stœchiométriquement à la plasmine déjà formée et l'empêchent d'agir sur ses substrats : fibrine, fibrinogène, facteurs V et VIII.

Ils paraissent adaptés au traitement des hémorrapgies graves contre lesquelles il importe d'intervenir rapidement.

-- les inhibiteurs synthétiques qui agissent essentiellement comme antiactivateurs du plasminogène en neutralisant la formation des activateurs à partir des proactivateurs et en empêchant l'action des activateurs directs.

Ils peuvent être employés à titre curatif, mais surtout ils apportent la possibilité d'un traitement préventif dans les cas où il y a risque de fibrinolyse (chirurgie, obstétrique, etc...).

En outre, et surtout dans le cadre de cet usage prophylactique qui donne lieu parfois à des traitements prolongés, les inhibiteurs synthétiques présentent, par rapport aux inhibiteurs d'origine naturelle, l'avantage important de pouvoir être administrés par voie orale.

Ce sont les antifibrinolytiques de synthèse qui font l'objet de notre étude.

DEUXIEME PARTIE

LES INHIBITEURS SYNTHETIQUES DE LA FIBRINOLYSE.

SYNTHESE DE QUELQUES ε-AMINOACIDES SUSCEPTIBLES DE PRESENTER UNE ACTIVITE ANTIFIBRINOLYTIQUE.

La connaissance des séries chimiques auxquelles appartiennent les inhibiteurs synthétiques de la fibrinolyse nous est nécessaire pour orienter nos recherches vers la synthèse de nouveaux inhibiteurs.

Nous analysons dans un premier chapitre, les résultats publiés au sujet de molécules douées de pouvoir antifibrinolytique. Les cinq chapitres suivants sont consacrés à l'étude des méthodes de synthèse d'éventuels nouveaux inhibiteurs.

CHAPITRE I

LES INHIBITEURS SYNTHETIQUES DE LA FIBRINOLYSE

La recherche des inhibiteurs synthétiques de la fibrinolyse a été entreprise en 1947 par S. OKAMOTO dans le but de lutter contre les hémorragies localisées ou généralisées imputables à une hyperfibrinolyse.

Comme nous venons de le rappeler, certains éléments du système plasminogène-plasmine et le mécanisme de l'activation du plasminogène ne sont, actuellement encore, que très imparfaitement connus.

Les renseignements d'ordre théorique dont disposaient les chercheurs en 1947 étaient très peu nombreux et ne pouvaient orienter les recherches vers un type particulier de composés ; c'est donc un travail d'essai systématique de très nombreuses molécules qui fut entrepris.

En essayant environ 600 composés chimiques, S. OKAMOTO et col. (107) purent découvrir les propriétés recherchées dans l'acide epsilon aminocaproïque (AEAC) pour lequel un brevet fut demandé en 1953 et délivré en 1957 (108). Ce fut le point de départ d'une thérapeutique antifibrinolytique et d'une étude plus générale sur un sujet auquel se sont intéressés plusieurs groupes de chercheurs.

La chronologie des travaux est parfois compliquée par la publication simultanée de résultats comparables obtenus par diverses équipes et par l'existence de plusieurs types, légèrement différents, de molécules douées de propriétés antifibrinolytiques.

Avec le but de dégager une vue d'ensemble des propriétés des nombreuses molécules mentionnées dans les principales publications, nous envisagerons successivement les résultats obtenus pour différents types de composés que nous regrouperons de la façon suivante :

- Dérivés linéaires du type AEAC
- Dérivés de la lysine
- Dérivés cycliques des types PAMBA et AMCHA
- Dérivés bicycliques
- Composés possédant un groupement amidine.

Note importante :

Si nous rassemblons ici les résultats obtenus dans la recherche des propriétés antifibrinolytiques de très nombreux composés, il faut préciser qu'il est très difficile d'établir exactement le degré d'efficacité relative de chacun, et ceci pour plusieurs raisons.

- Tout d'abord,suivant les auteurs, les méthodes utilisées pour la détermination de l'activité antifibrinolytique ne sont pas les mêmes ; elles conduisent à mesurer des grandeurs différentes, par exemple : un temps de lyse, une surface de lyse ou une concentration nécessaire pour obtenir une lyse déterminée. Ces grandeurs ne sont que plus ou moins directement liées au phénomène complet de la lyse ; les résultats quantitatifs de l'appréciation de l'efficacité d'un composé dépendent donc de la méthode choisie.

- Ensuite, pour pouvoir classer les composés antifibrinolytiques en fonction de leur activité, il faudrait que chacun, quel que soit le type auquel il appartient, puisse être comparé au même antifibrinolytique. De l'ensemble des travaux, il apparaît que l'AEAC a, pour la plupart des auteurs, joué ce rôle d'inhibiteur de référence. Dans certains cas cependant, la comparaison est faite par rapport à un autre inhibiteur.

- Enfin le plus souvent, les auteurs ont publié les tableaux de grandeurs mesurées, pour un petit groupe de composés, selon diverses méthodes. A partir de ces valeurs, ils ont développé une discussion qualitative mais sans donner de valeur numérique au pouvoir inhibiteur.

Cependant, pour pouvoir effectuer une comparaison d'ensemble, nous avons associé à chaque molécule une valeur numérique qui représente son activité relative, mais sur nos tableaux nous distinguerons :

. les valeurs soulignées, 20 par exemple, qui ont été publiées ou que nous avons seulement multipliées par un terme constant afin de ramener la valeur de l'AEAC à 100. Pour les travaux dans lesquels le composé choisi pour référence est l'acide para aminométhyl benzoïque (PAMBA), nous avons attribué à ce composé la valeur 400 qui représente une moyenne entre les mesures effectuées, par différents auteurs, par rapport à l'AEAC.

. les valeurs entre parenthèses, (20) par exemple, que nous avons déduites des données expérimentales publiées, en fixant la valeur de l'AEAC à 100. Elles ne sont que très approximatives et n'ont été dégagées qu'afin de pouvoir discuter des relations structure-activité dans le domaine des antifibrinolytiques en général.

Les Tableaux I à V sont groupés en fin de chapitre pages 48 à 55.

I - DERIVES LINEAIRES DU TYPE AEAC (Tableau I)

La molécule type de ce groupe de composés est l'acide epsilon amino-caproïque (AEAC) ou acide amino-6 hexanoïque découvert par S. OKAMOTO (108)

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH$$

C'est un acide aminé en position terminale ; il n'existe pas à l'état naturel dans l'organisme. A partir de ce modèle, diverses modifications ont été envisagées sur :

- la longueur de la chaîne
- la nature de certains maillons de la chaîne
- la fonction acide
- la fonction amine.

1° - Modifications apportées à la longueur de la chaîne

D'après différents travaux (107, 109, 110, 114, 117, 118), la série des acides aminés en position terminale

$$H_2N - (CH_2)_n - COOH$$

a été étudiée pour les valeurs de n allant de 1 à 8 et pour n = 10. Les techniques de mesure de l'activité de ces composés varient d'un auteur à l'autre, mais il ressort des différents travaux que l'efficacité de ces molécules présente un maximum très prononcé pour n = 5 et qu'elle décroit très rapidement lorsque n s'écarte de 5 (107) :

n	=	1	2	3	4	5	6	7	8
activité	=	0	0	4	20	100	10	3	0

Cela permet de supposer (107, 110) que la distance optimale entre les fonctions acide et amine doit être de 7 Å environ.

2 ° - Modifications apportées à la nature de certains maillons de la chaîne

a) Remplacement d'un $-CH_2-$ par $-CO-$

L'acide δ amino lévulinique (109)

$$H_2N - CH_2 - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - CH_2 - CH_2 - COOH$$

n'a plus que le tiers de l'activité de l'AEAC, mais il faut remarquer que la chaîne ne comporte plus que 5 carbones. Toutefois si l'on compare cet acide à l'acide δ amino

valérique qui a la même longueur de chaîne (109) on constate que l'introduction de -CO- à la place de $-CH_2-$ diminue l'activité de la molécule.

b) Remplacement d'un $-CH_2-$ par -S-

L'acide S (β aminoéthyl) mercapto-3 propionique (111)

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - S - CH_2 - CH_2 - COOH$$

a perdu environ la moitié de l'activité de l'AEAC.

c) Substitution par NH_2 d'un H du carbone porteur de la fonction acide

De l'ensemble des résultats publiés il ressort que l'activité de la lysine (107, 109, 112, 121)

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}} - COOH$$

est environ 10 fois inférieure à celle de l'AEAC. Ses dérivés ont cependant donné lieu à un ensemble de travaux que nous détaillerons plus loin.

D'autres acides diaminés analogues à la lysine, comme l'ornithine, n'ont pas d'action.

La diminution de l'activité due à ces modifications montre que des caractéristiques de la chaîne, autres que la distance entre les groupes acide et amine, sont déterminantes pour les propriétés antifibrinolytiques.

3° - Modifications apportées à la fonction acide organique

a) Estérification

De nombreux esters de l'AEAC ont été essayés :

- Les esters obtenus à partir d'alcools en C_1, C_2, C_3 ont, in vitro, une activité quasi nulle (110).

- Les esters obtenus à partir d'alcools en C_4, C_5, C_6 auraient (112) une activité comparable, ou même supérieure, à celle de l'AEAC.

Ce résultat peut paraître surprenant car il n'a provoqué aucune confirmation ni aucun écho de la part de chercheurs d'autres groupes, et d'autant plus que dans la série des composés cycliques (123) les esters quels qu'ils soient n'ont montré aucune activité in vitro.

Si une activité in vivo a pu être constatée pour certains esters c'est vrai-

semblablement parce que la structure acide était régénérée après une hydrolyse dans l'organisme.

b) Remplacement de la fonction acide par la fonction amide, hydrazide ou amine

L'amide primaire (110, 111, 113), l'hydrazide (110) ou l'amine primaire (109) en remplacement de la fonction acide font perdre toute activité à la molécule.

c) Remplacement du groupe carboxylique par le groupe sulfonique

Dans l'acide sulfonique correspondant à l'AEAC un dixième seulement de l'activité de la molécule est conservée.

4° - Modifications apportées à la fonction amine

a) Amines substituées

Le remplacement du groupe amine primaire par un groupe amine secondaire (107) ou tertiaire (107, 109) entraîne une diminution de l'efficacité de la molécule.

b) Remplacement de $-NH_2$ par $-NH - CO - R$

De tels composés, plusieurs fois essayés (110, 111, 112, 113) n'ont jamais montré d'activité.

c) Remplacement de $-NH_2$ par $-NH - C\ (=Y) - NH_2$

Qu'il s'agisse du composé carbamoylé (Y = 0) (111) ou guanidique (Y = NH) (110), la nouvelle molécule a perdu toute activité.

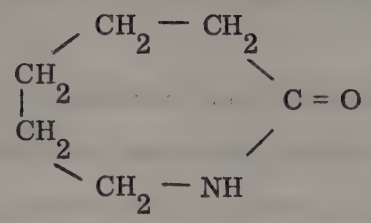
Ces deux groupes de résultats montrent toute l'importance que revêtent les fonctions acide et amine terminales. Il semble bien qu'elles soient nécessaires à l'activité antifibrinolytique.

5° - Modifications par cyclisation

a) Lactames

Certains auteurs (115) ont aussi essayé le composé cyclique correspondant à la perte d'une molécule d'eau entre la fonction acide et la fonction amine de l'AEAC,

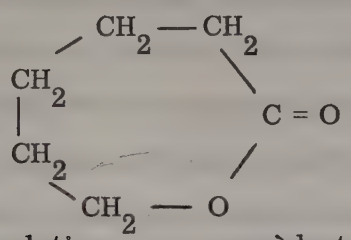
c'est-à-dire le caprolactame.



Ils ont constaté qu'il inhibe l'action lytique de la plasmine vis à vis de la caséine d'une façon comparable à celle de l'AEAC et vis à vis de la fibrine s'il est employé à forte concentration ; en présence d'activateur, tel que la streptokinase ou l'urokinase, l'effet inhibiteur apparaît dès les faibles concentrations. Le valérolactame et le butyrolactame, qui possèdent respectivement un et deux CH_2 de moins dans le cycle, présentent une efficacité moins grande.

b) Lactones

Les mêmes auteurs ont ensuite essayé les lactones correspondantes (116). La caprolactone



est douée d'un pouvoir antifibrinolytique, que possèdent également, mais à un dégré moindre, la valérolactone et la butyrolactone.

Ils notent bien le côté surprenant de ces observations, mais ils suggèrent que ces molécules interviennent peut-être en formant des liaisons électrostatiques et hydrophobiques avec le système de la fibrinolyse (116).

Nous pensons cependant que ces résultats obtenus avec les lactames qui ne possèdent plus les fonctions acide et amine libre, et à plus forte raison avec les lactones qui seraient les seules molécules actives ne possédant pas d'atome d'azote, doivent être considérés avec réserve ; d'autant plus que cette activité des lactames et lactones n'a jamais été signalée par ailleurs.

II - DERIVES DE LA LYSINE (Tableau II)

Un ensemble assez important de travaux a trait au groupe des dérivés de la lysine, dont le pouvoir antifibrinolytique est en général assez médiocre ; ils ont surtout été envisagés au début de la période d'étude des antifibrinolytiques de synthèse.

Les premières publications sont dues à l'équipe japonaise de Y. YAMAMURA (112, 119) et relatent les résultats suivants :

- La lysine elle-même (acide diamino-2, 6 hexanoïque) présente une activité fibrinolytique, mais nettement plus faible que celle de l'AEAC.

- La plupart de ses dérivés, obtenus par transformation de l'une ou l'autre des fonctions amines par une fonction -NH - CO - R sont dépourvus d'activité ; pour les seuls composés où R = C_6H_5, le pouvoir inhibiteur est plus élevé que celui de la lysine et peut être comparé à celui de l'AEAC.

- Le résultat très prometteur obtenu avec la NN' dicarbobenzyloxy L lysyl N ε carbobenzyloxy L lysine (119) semble être dû à un artéfact.

- Une expérimentation effectuée, in vivo seulement, avec la dilauroyl L lysine et la dimyristoyl L lysine (120) semblait aussi très encourageante, mais il est surprenant, et regrettable, pour le crédit que l'on aurait pu y donner, qu'elle n'ait pas été confirmée par d'autres essais.

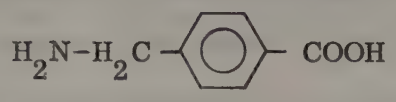
A l'occasion d'études de mécanisme, L. SKOZA et col. (121) remarquent l'activité antifibrinolytique des dipeptides comportant un reste lysine C terminal alors que les composés comportant un reste lysine N terminal n'ont pas d'action.

Plus récemment, dans le cadre d'une étude recherchant, pour certaines molécules, un parallèle entre les propriétés antistaphylocoques et les propriétés antifibrinolytiques A. FUJII et col. (122) ont envisagé des composés du type Nα (ω aminoacyl) L lysine, qui ont un pouvoir antifibrinolytique supérieur à celui de la lysine, mais inférieur à celui de l'AEAC. Si on les considère comme dérivés des ω aminoacides, il semble que, pour les premiers termes, la lysine augmente le pouvoir inhibiteur, alors que pour l'acide aminocaproïque elle le diminue. Cet aspect demeure assez original.

III - DERIVES CYCLIQUES DES TYPES PAMBA ET AMCHA (Tableau III)

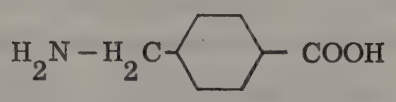
Ces molécules possèdant des propriétés antifibrinolytiques rappèlent l'AEAC par le nombre de maillons carbonés qui séparent les fonctions acide et amine, mais certains carbones appartiennent

- à un cycle benzénique, dans l'acide para aminométhyl benzoïque ou PAMBA



qui est 4 à 5 fois plus actif que l'AEAC (107, 110, 112, 121, 123, 124, 125),

- à un cycle cyclohexanique, dans l'acide trans aminométhyl-4 cyclohexane carboxylique ou AMCHA



qui est 8 à10 fois plus actif que l'AEAC (107, 110, 121, 124, 125).

Deux équipes de chercheurs ont particulièrement étudié ces composés : l'équipe de S. OKAMOTO au Japon et l'équipe de F. MARKWARDT en Allemagne, qui ont simultanément et indépendamment publié de nombreux résultats vers le début des années 1960. Il semble que l'équipe japonaise soit à l'origine du composé saturé (129), et que l'équipe allemande ait proposé la première le composé aromatique (130).

Sur ce modèle cyclique, en série aromatique et en série aliphatique, de nombreuses modifications moléculaires ont été envisagées ; elles font intervenir

- la position du cycle entre les fonctions acide et amine
- le stéréoisomérie en série cyclanique
- le rôle des substituants sur le cycle
- la fonction acide
- la fonction amine

1° - Position du cycle entre les fonctions acide et amine

Nous remarquons que pour les composés actifs, comme pour l'AEAC, la fonction amine est fixée en position 6 par rapport à la fonction acide ;

- la suppression d'un maillon conduit à l'acide para amino benzoïque et à l'acide p-amino cyclohexane carboxylique qui n'ont respectivement pas ou pratiquement pas d'activité (107, 110).

- l'allongement par un maillon supplémentaire (acide para aminométhyl phénylacétique) entraîne une forte diminution de l'activité (107, 110).

Si le groupe CH_2 porteur de la fonction amine est supprimé, tandis qu'un autre groupe CH_2 est intercallé entre le cycle et la fonction acide, les distances entre les fonctions NH_2 et COOH sont conservées. Cependant l'acide para amino phénylacétique est sans action et son homologue saturé n'est que très faiblement actif. La fonction amine directement liée au cycle, entraîne donc pratiquement la suppression de l'activité (107, 110).

Lorsque le groupe aminométhyl ou le groupe aminoéthyl est lié en ortho du groupe carboxylique (107), l'efficacité est fortement diminuée. Il faut remarquer que la distance entre les groupes fonctionnels est alors diminuée de deux et de un maillon carboné.

2° - Stéréoisomérie en série cyclanique

Les premières expériences effectuées avec l'AMCHA (129) ne précisaient pas si l'activité observée était également due aux deux isomères possibles. Mais il fut vite établi que l'activité antifibrinolytique de la préparation provenait du dérivé TRANS alors que le dérivé CIS était pratiquement sans action (131). Ce résultat peut être interprété de la façon suivante : dans le composé trans AMCHA les positions relatives des fonctions acide et amine sont pratiquement similaires à celles qu'elles occupent dans la configuration "étirée" de l'AEAC ; mais il ne s'agit que d'une des possibilités de configuration de l'AEAC, ce qui explique que ce composé soit moins efficace que le trans AMCHA. Par contre dans le composé CIS les fonctions acide et amine sont beaucoup plus rapprochées et à ces positions relatives il ne correspond aucune activité. Certaines différences importantes dans les valeurs attribuées à l'efficacité de l'AMCHA sont vraisemblablement dues à différents degrés de pureté de l'isomère TRANS.

3° - Rôle des substituants sur le cycle

La modification par substitution sur le cycle, qui a tout d'abord été envisagée conduisit à l'acide para aminométhyl salicylique (107, 111, 125, 126) et au composé saturé correspondant (107, 126). Tous deux sont actifs, mais le remplacement d'un hydrogène du cycle par un groupe hydroxyle diminue l'action inhibitrice des composés.

La substitution par un groupe NO_2 a aussi été essayée (111, 123) mais elle diminue le pouvoir inhibiteur de moitié.

4° - Modifications de la fonction acide

Les transformations de la fonction acide en fonction ester et en fonction amide (111, 123) entraînent une perte considérable de l'activité. Seuls les esters n butylique, i butylique, benzylique et éthyl-2 hexylique restent actif in vitro (123) ; mais aucune explication n'est donnée.

Récemment l'ester (carboxy-2 éthyl)-4 phénylique a été signalé (128) pour ses propriétés inhibitrices.

Le remplacement de la fonction acide carboxylique par la fonction acide sulfonique, conduit à une nette diminution de l'activité pour certains auteurs (107), alors qu'elle paraît moins importante ou négligeable pour d'autres (121, 124).

Le dérivé benzène sulfonamide,où le groupement -COOH est remplacé par le groupement $-SO_2NH_2$,accuse une très forte diminution d'activité (110).

5° - Modifications de la fonction amine

Un dérivé N-acétyl ou N-carbamoyl du PAMBA est dépourvu de toute activité (111, 125).

L'amine secondaire comportant deux radicaux identiques (méthyl benzoate d'éthyle) apparaît dépourvue d'activité (123), ce qui est expliqué il est vrai, comme nous venons de le voir, par la présence de la fonction ester.

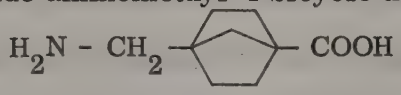
IV - DERIVES BICYCLIQUES (Tableau IV)

Ce nouveau type de composés, doués de propriétés antifibrinolytiques fut proposé plus récemment, en 1969 et 1970 par W. BAUMGARTEN et ses collaborateurs des Laboratoires MERCK SHARP et DOHME (132, 133, 134). Ces auteurs ont tout d'abord analysé les principaux paramètres qui semblent caractériser les molécules actives déjà décrites :

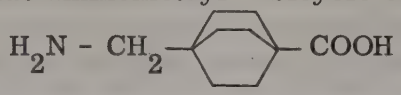
- groupe aminométhyl et groupe acide séparés l'un de l'autre par quatre maillons carbonés
- rigidité de la molécule qui impose la position relative des groupes amine et acide et dont la plus favorable est celle du trans AMCHA.

Puis ils ont préparé (133) une série de molécules respectant ces conditions en imaginant, pour assurer la rigidité du cycle porteur des groupements fonctionnels, un pontage pouvant comporter

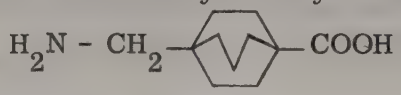
- un maillon CH_2 : ex. l'acide aminométhyl-4 bicyclo heptane-2, 2, 1 carboxylique



- deux maillons CH_2 : ex. l'acide aminométhyl-4 bicyclo octane-2, 2, 2 carboxylique



- trois maillons CH_2: ex. l'acide aminométhyl-4 bicyclo nonane -3, 2, 2 carboxylique



Ces trois composés ont une forte activité antifibrinolytique, respectivement 500, 10 000 et 2 000 soit 0, 5, 10 et 2 fois supérieure à celle du composé non ponté, l'AMCHA.

W. BAUMGARTEN et col. (133) ont évalué la dimension de la partie rigide de ces molécules, c'est-à-dire la distance entre le carbone du groupe COOH et le carbone porteur du groupe NH_2, et l'ont comparée à la valeur de l'activité antifibrinolytique.

distance en Å	5, 34	5, 67	5, 76	5, 82
activité relative	500	10 000	2 000	1 000

Il semble donc que cette distance soit extrêmement critique pour l'efficacité de la molécule.

Sur le modèle de l'acide aminométhyl-4 bicyclo octane-2, 2, 2 carboxylique qui apparaît comme le plus efficace de ces acides aminés, les diverses modifications moléculaires qui ont été apportées (133) sont suivies d'un abaissement du pouvoir inhibiteur, qu'il s'agisse

- de l'introduction d'une double liaison dans le cycle
- de substituants sur le cycle ou sur le carbone porteur du NH_2
- de substituants conduisant à des dérivés de la fonction amine ou de la fonction acide
- de la suppression du CH_2 porteur de la fonction amine, même compensée par un CH_2 placé entre le cycle et la fonction acide.

Les résultats figurant dans le Tableau IV montrent que d'autres paramètres viennent s'ajouter à celui de la distance ; ainsi l'encombrement stérique revêt lui aussi une grande importance. Les valeurs de pK de la molécule ont aussi été considérées (133), mais jouent un rôle plus secondaire.

La structure plus originale d'un cubane a aussi été réalisée (133) mais le composé a une efficacité plus faible que ne le laisserait supposer la distance entre les groupes acide et amine. Ceci peut s'expliquer par l'encombrement du noyau cubique.

Le dérivé du type spiro heptane est sans action ; ce qui semble moins aisé à expliquer par la même raison.

Une équipe japonaise a récemment constaté les propriétés antifibrinolytiques d'un dérivé de la décaline (135, 136).

D'une façon générale, cet ensemble de dérivés bicycliques est dominé par l'acide aminométhyl-4 bicyclo octane-2, 2, 2 carboxylique qui a une activité cent fois plus grande que celle de l'AEAC et dix fois plus grande que celle de l'AMCHA. Cette très grande efficacité évaluée quantitativement in vitro a aussi été confirmée par des expériences effectuées in vivo (132, 133) qui ont aussi montré que le composé est atoxique et dépourvu d'effets secondaires.

Cependant, pour l'instant, seuls l'AEAC et l'AMCHA sont utilisés en thérapeutique ; le composé bicyclique n'a, à notre connaissance, donné lieu à aucune application pratique.

V - INHIBITEURS POSSEDANT UN GROUPEMENT AMIDINE (Tableau V)

Les chercheurs de l'équipe de EMARKWARDT (137, 138) ont constaté récemment, l'activité antifibrinolytique de l'acide amidino-4 phényl pyruvique, qui avait déjà été reconnu comme inhibiteur de l'entérokinase et de la trypsine par J. D. GERATZ (139).

Ce composé est également doué de propriétés antistreptokinase, mais il se révèle aussi un agent antithrombine ; autrement dit c'est un inhibiteur agissant à la fois sur la coagulation et sur la fibrinolyse.

Les diamidines aromatiques étudiées par J. D. GERATZ (140, 141) possèdent aussi des propriétés d'inhibition

- de l'activité coagulante de la thrombine
- de l'activité lytique de la plasmine, par l'intermédiaire de la streptokinase, activateur du plasminogène.

En fait il s'agit là d'un type de composés qui possèdent bien des propriétés antifibrinolytiques mais celles-ci ne représentent qu'un aspect de leur rôle d'inhibiteur enzymatique en général.

Leur structure chimique s'écarte d'ailleurs nettement de celle des antifibrinolytiques spécifiques déjà mentionnés et auxquels nous limiterons notre intérêt.

VI - CONCLUSION

A - MECANISME D'ACTION DES ANTIFIBRINOLYTIQUES DE SYNTHESE

Nous venons de rappeler l'ensemble des constatations relatives à l'efficacité des inhibiteurs synthétiques de la fibrinolyse. Il s'en dégage essentiellement que ces composés tels l'AEAC ou l'AMCHA sont des acides aminés dont la distance entre les pôles fonctionnels paraît extrêmement critique.

Ces caractéristiques, sûrement établies et confirmées, peuvent-elles être rattachées au mécanisme d'action de ces molécules ?

Pour certains auteurs (79, 142, 143) l'AEAC et l'AMCHA sont tout d'abord les inhibiteurs de l'activation du plasminogène, la plasmine elle même n'étant inhibée que par de fortes concentrations. Pour d'autres (129, 144), ces composés agissent essentiellement en inhibant la plasmine, ou tout au moins agissent autant sur la plasmine que sur l'activation du plasminogène.

Dans l'intention de clarifier les conclusions antérieures et de mieux connaître le mécanisme d'action, dans le plasma, de l'inhibition du système fibrinolytique par des composés de synthèse, J. L. AMBRUS effectua en 1968 un grand nombre d'investigations d'où il conclue (145) que le mode d'inhibition enzymatique par AEAC ou AMCHA dépend du substrat, de l'enzyme et de l'activateur employé. Ainsi

- avec un substrat de caséine
  - si l'activateur est la streptokinase, l'AEAC et l'AMCHA sont surtout des inhibiteurs de l'activation
  - si l'activateur est l'urokinase, et pour des concentrations habituelles d'inhibiteur, on n'observe qu'une faible inhibition.
- avec un substrat de fibrine
  - si les essais sont réalisés dans un tube, où tous les réactifs sont en contact avec les fibres de fibrine, il y a égalité entre l'inhibition de l'activation du plasminogène et l'inhibition de l'activité de la plasmine elle-même.

. si l'inhibiteur est essayé sur des caillots de fibrine préformée, l'inhibition est très faible.

Ces résultats permettent difficilement de proposer un seul type de mécanisme mais laissent plutôt supposer qu'au niveau du plasma surtout, des mécanismes complémentaires interviennent.

Des nombreux autres travaux intéressants effectués dans le but de mieux connaître ce processus de l'inhibition (132, 146, 147, 148, 149), il apparaît entre autres, la possibilité d'une action directe sur le fibrinogène, et il en résulte d'une façon générale que l'inhibition intervient au niveau de l'activation du système enzymatique de la fibrinolyse.

En 1972, W. BAUMGARTEN (134) reprenant l'ensemble des résultats obtenus depuis une quinzaine d'années, ne peut que conclure : "En dépit des efforts considérables déployés pour essayer d'élucider le mécanisme de l'action des composés antifibrinolytiques, la compréhension du phénomène est encore subordonnée aux résultats de futures investigations."

Il est donc impossible d'établir une relation entre la structure chimique des inhibiteurs et le rôle qu'ils jouent dans le mécanisme de la fibrinolyse.

Pour la recherche de nouveaux inhibiteurs synthétiques nous ne pouvons donc pas raisonner à partir du rôle qu'ils doivent jouer ; nous pouvons seulement raisonner à partir des relations structure-activité qui ont été constatées et que nous venons d'analyser.

B - PROJET D'INVESTIGATIONS AYANT POUR BUT LA DECOUVERTE DE NOUVEAUX COMPOSES DOUES DE PROPRIETES ANTIFIBRINOLYTIQUES

L'étude analytique que nous venons d'exposer nous suggère de rechercher l'éventuel pouvoir antifibrinolytique de plusieurs composés que nous classons de la façon suivante :

a) groupe des lactames et lactones

Nous avons expliqué pourquoi l'activité de ces composés doit être considérée avec réserve. Nous nous proposons de les expérimenter nous mêmes.

b) groupe des dérivés du PAMBA

Si de nombreux dérivés du PAMBA ont déjà été essayés, trois composés courants, qui peuvent être considérés comme dérivés du PAMBA par remplacement de la fonction aminométhylepar une autre fonction, sont passés sous silence : les acides benzoïques qui possèdent en para une fonction acide carboxylique, aldéhyde ou sulfonamide. Dans les deux premiers cas la substitution doit entraîner la perte de l'activité, mais on ne peut prédire l'effet du remplacement de CH_2NH_2 par SO_2NH_2.

c) groupe des diacides aminés

Au début des travaux sur les antifibrinolytiques une place importante avait été consacrée à la lysine, acide diaminé ; on peut se demander si le diacide aminé de même longueur de chaîne, l'acide amino-2 pimélique, est aussi doué d'un pouvoir inhibiteur. Par ailleurs, l'aspartate de sodium a été cité comme agent antifibrinolytique (150). Une étude complète de la série des diacides aminés doit donc être entreprise.

d) groupe des dipeptides

Cinq maillons CH_2 séparent la fonction amine de la fonction acide de l'AEAC. Deux modifications seulement dans la nature de la chaîne ont été envisagées : remplacement d'un CH_2 par un groupe C = O ou par un atome de soufre. La question se pose de savoir quelle activité aurait un composé dont les deux fonctions en bout de chaîne seraient inchangées, mais dont deux maillons CH_2 seraient remplacés par un groupement amide.

Cette modification nous semble avoir d'autant plus d'intérêt, que deux dipeptides naturels correspondent à cette structure :

la glycyl β-alanine $H_2N - CH_2 - CO - NH - CH_2 - CH_2 - COOH$

la β-alanyl glycine $H_2N - CH_2 - CH_2 - CO - NH - CH_2 - COOH$

Il paraît aussi intéressant d'essayer de préparer, sur ce modèle, le composé où CO et NH sont inversés :

la N (hydroxymalonyl) éthylène diamine $H_2N - CH_2 - CH_2 - NH - CO - CH_2 - COOH$

la longueur de la chaîne et les propriétés physico-chimiques seraient pratiquement les mêmes, mais le composé ne serait plus un dipeptide.

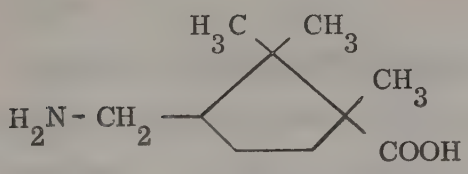
e) groupe des acides aminés cycliques

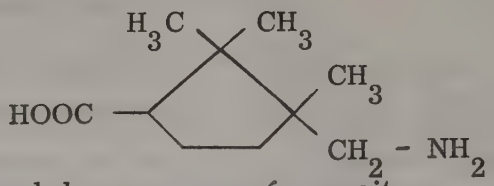
Pour des molécules dans lesquelles une fonction acide et une fonction amine sont séparées par cinq maillons carbonés, la présence d'un cycle introduit une rigidité à laquelle semble liée toute valeur importante du pouvoir antifibrinolytique.

Si le cycle en C_6, aromatique ou cyclanique, a été très souvent envisagé avec tous les dérivés du PAMBA et de l'AMCHA, on constate que le cycle pentanique n'a jamais retenu l'attention.

Il nous faudrait préparer l'acide aminométhyl-3 cyclopentane carboxylique

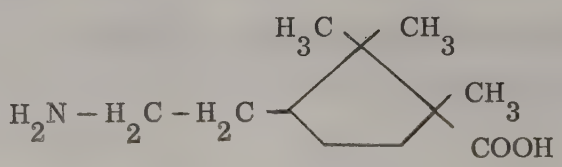
qui n'a pas été décrit. Par contre, sur ce modèle, existent deux composés, les acides aminocampholiques, qui n'en diffèrent que par la présence de trois groupements méthyle fixés sur le cycle





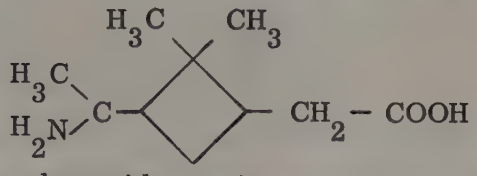
Un pouvoir antifibrinolytique éventuel de ces composés serait d'autant plus intéressant qu'ils dérivent du camphre, source naturelle et commode de nombreuses molécules médicamenteuses.

Dans la mesure où le passage du cycle en C_6 au cycle en C_5 entraîne une diminution de la distance entre la fonction acide et la fonction amine de la molécule, on peut envisager de la compenser en préparant un composé possédant un maillon CH_2 de plus.



Ce composé est décrit mais les difficultés de sa préparation lui font perdre son intérêt.

Mais une analogie avec ce composé existe dans un dérivé de l'acide pinonique.



Comme dans le cas des acides aminocampholiques, le pouvoir antifibrinolytique de ce composé serait d'autant plus intéressant qu'il peut être facilement préparé à partir de l' α pinène de l'essence de térébenthine.

Les dérivés possédant un cycle en C_5 ou en C_4 nous suggèrent également l'étude d'un ε aminoacide comportant à la fois les deux cycles en C_5 et C_4: l'acide amino-6 pénicillanique, d'une très grande importance thérapeutique et qui a fait l'objet de nombreuses études, mais aucune n'ayant trait à l'éventualité de son pouvoir antifibrinolytique. Il doit en être vraisemblablement dépourvu, ne serait-ce qu'en raison de la fonction amine - et non pas aminométhyle - liée au cycle. Toutefois il semble intéressant, dans le cadre de notre travail, de vérifier cette hypothèse.

Enfin, parmi les composés bicycliques, un dérivé de l'acide diphénique respecte la condition des cinq maillons carbonés entre la fonction amine et la fonction acide ; nous essayerons de le préparer pour rechercher son possible pouvoir inhibiteur.

Pour réaliser notre projet de recherche de nouveaux inhibiteurs de la fibrinolyse il nous faut tout d'abord synthétiser :

- l'acide dl amino-2 pimélique
- la N (hydroxymalonyl) éthylène diamine
- les acides aminocampholiques
- l'acide (diméthyl-2, 2 α aminoéthyl-3) cyclobutane acétique
- l'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle.

TABLEAU I - DERIVES LINEAIRES DU TYPE AEAC

Réf.	Auteurs	Composés		Activité *	Grandeur mesurée
109	1960 NILSSON et col.	Acide amino-6 caproïque	$H_2N-(CH_2)_5-COOH$	(100)	temps de lyse d'un caillot artificiel
		Acide amino-5 valérique	$H_2N-(CH_2)_4-COOH$	(60)	
		Acide amino-5 lévulinique	$H_2N-CH_2-CO-CH_2-CH_2-COOH$	(35)	
		Acide amino-8 caprylique	$H_2N-(CH_2)_7-COOH$	(25)	
		Acide amino-4 butyrique	$H_2N-(CH_2)_3-COOH$	(5)	
		Lysine	$H_2N-(CH_2)_4-CH(NH_2)-COOH$	(5)	
		Ornithine	$H_2N-(CH_2)_3-CH(NH_2)-COOH$	(2)	
		Cadavérine	$H_2N-(CH_2)_5-NH_2$	(2)	
		Putrescéine	$H_2N-(CH_2)_4-NH_2$	(2)	
110	1964 MARKWARDT et col.	Acide N acétyl amino-6 caproïque	$CH_3-CO-NH-(CH_2)_5-COOH$	(1)	temps de lyse d'un caillot de plasma et temps de lyse d'un caillot d'euglobulines
		Acide N diméthyl amino-6 caproïque	$(CH_3)_2N-(CH_2)_5-COOH$	(2)	
		Acide N glycyl amino-6 caproïque	$H_2N-CH_2-CO-NH-(CH_2)_5-COOH$	(1)	
		Acide N benzoyl amino-6 caproïque	$C_6H_5-CO-NH-(CH_2)_5-COOH$	(1)	
		Acide guanidino-6 caproïque	$H_2N-C(=NH)-NH-(CH_2)_5-COOH$	(1)	
		Esters de l'acide amino-6 caproïque	$-CH_3$ $-C_2H_5$ $-nC_3H_7$ $-iC_3H_7$	(15) (10) (15) (5)	
		Amide "	$H_2N-(CH_2)_5-CO-NH_2$	(2)	
		Hydrazide "	$H_2N-(CH_2)_5-CO-NH-NH_2$	(2)	
		Glycine	$H_2N-(CH_2)-COOH$	(1)	
		β Alanine	$H_2N-(CH_2)_2-COOH$	(1)	
		Acide amino-4 butyrique	$H_2N-(CH_2)_3-COOH$	(5)	
		Acide amino-5 valérique	$H_2N-(CH_2)_4-COOH$	(35)	
		Acide amino-6 caproïque	$H_2N-(CH_2)_5-COOH$	(100)	
		Acide amino-7 heptanoïque	$H_2N-(CH_2)_6-COOH$	(10)	
111	1964 MARKWARDT et col.	Acide amino-6 caproïque	$H_2N-(CH_2)_5-COOH$	100	temps de lyse d'un caillot de plasma + essais in vivo/chien
		Amino-6 caproate d'éthyle	$H_2N-(CH_2)_5-COOC_2H_5$	10	
		Amino-6 hexanoamide	$H_2N-(CH_2)_5-CO-NH_2$	0	
		Acide N acétyl amino-6 caproïque	$CH_3-CO-NH-(CH_2)_5-COOH$	0	
		Acide N carbamoyl amino-6 caproïque	$H_2N-CO-NH-(CH_2)_5-COOH$	0	
		Acide S(amino-2 éthyl) 3 mercaptopropionique	$H_2N-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-COOH$	40	
112	1965 YAMAMURA et col.	Acide amino-6 caproïque	$H_2N-(CH_2)_5-COOH$	(100)	temps de lyse d'un caillot d'euglobulines + fibrinogène
		Acide N carbobenzoxyamino-6 caproïque	$C_6H_5-CH_2-OOC-NH-(CH_2)_5-COOH$	(0)	
		Esters de l'acide amino-6 caproïque	$-nC_4H_9$ $-nC_5H_{11}$ $-nC_6H_{12}$ $-iC_4H_9$ $-iC_5H_{11}$	(105) (110) (210) (90) (85)	
		Acide amino-6 caproyl-glycine	$H_2N-(CH_2)_5-CO-NH-CH_2-COOH$	(10)	
		Acide amino-6 caproyl-acide amino-6 caproïque	$H_2N-(CH_2)_5-CO-NH-(CH_2)-COOH$	(5)	

TABLEAU I - (suite)

Réf.	Auteurs	Composés		Activité *	Grandeur mesurée
113	1966 BERTELLI et col.	Acide amino-6 caproïque Acide N acétyl amino-6 caproïque N acétyl amino-6 capronamido N acétyl amino-6 caproate d'éthyle	$H_2N-(CH_2)_5-COOH$ $CH_3-CO-NH-(CH_2)_5-COOH$ $CH_3-CO-NH-(CH_2)_5-CO-NH_2$ $CH_3-CO-NH-(CH_2)_5-COOC_2H_5$	(100) (0) (0) (0)	temps de lyse d'un caillot d'euglobulines
114 et 117	1967 et 1968 GRAVILOV et col.	Acide amino-6 caproïque Acide amino-7 énanthique Acide amino-5 valérique Acide amino-11 undécanoïque Acide amino-4 butyrique	$H_2N-(CH_2)_5-COOH$ $H_2N-(CH_2)_6-COOH$ $H_2N-(CH_2)_4-COOH$ $H_2N-(CH_2)_{10}-COOH$ $H_2N-(CH_2)_3-COOH$		activités décroissantes observées in-vivo/lapin (sans ou avec streptokinase)
115	1967 DOLESCHEL et col.	Caprolactame Valérolactame Butyrolactame	$HN-(CH_2)_5-C=O$ $HN-(CH_2)_4-C=O$ $HN-(CH_2)_3-C=O$	(100) (50) (15)	surface de lyse sur plateaux de caséine
116	1967 DOLESCHEL et col.	Caprolactone Valérolactone Butyrolactone	$O-(CH_2)_5-C=O$ $O-(CH_2)_4-C=O$ $O-(CH_2)_3-C=O$	(60) (40) (10)	surface de lyse sur plateaux de fibrine
107	1968 OKAMOTO et col.	Acide amino-6 caproïque Acide amino-5 valérique Acide amino-4 butyrique β alanine Glycine Acide amino-7 heptanoïque Acide amino-8 octanoïque Acide amino-9 pélargonique Amino-6 hexanoamido Acide amino-5 pentylsulfonique Acide méthyl amino-6 hexanoïque Acide diméthyl amino-6 hexanoïque Lysine	$H_2N-(CH_2)_5-COOH$ $H_2N-(CH_2)_4-COOH$ $H_2N-(CH_2)_3-COOH$ $H_2N-(CH_2)_2-COOH$ $H_2N-(CH_2)-COOH$ $H_2N-(CH_2)_6-COOH$ $H_2N-(CH_2)_7-COOH$ $H_2N-(CH_2)_8-COOH$ $H_2N-(CH_2)_5-CO-NH_2$ $H_2N-(CH_2)_5-SO_3H$ $H_3C-HN-(CH_2)_5-COOH$ $(H_3C)_2N-(CH_2)_5-COOH$ $H_2N-(CH_2)_4-CH(NH_2)-COOH$	100 20 4 0 0 10 3 0 10 10 50 25 10	surface de lyse sur plateaux de fibrine
118	1968 CHAPLYGINA et col.	Acide amino-6 caproïque Acide amino-7 énanthique Acide amino-9 pélargonique	$H_2N-(CH_2)_5-COOH$ $H_2N-(CH_2)_6-COOH$ $H_2N-(CH_2)_8-COOH$		activités décroissantes

* Voir note page 30

TABLEAU II - DERIVES DE LA LYSINE

Réf.	Auteurs	Composés			Activité x	Grandeur mesurée
					119 112	
119 et 112	1963 et 1965 YAMAMURA et col.	acide amino-6 caproïque	$H_2N-(CH_2)_5-COOH$		(100)	temps de lyse d'un caillot artificiel (fibrinogène + euglobulines)
		L lysine	$H_2N-(CH_2)_4-CH(NH_2)-COOH$		(10)	
		NN' dicaproyl L lysine	R = $CH_3-(CH_2)_5-CO-$	$RHN-(CH_2)_4-CH(NHR)-COOH$	(0)	
		NN' dibutyroyl "	R = $CH_3-(CH_2)_4-CO-$		(0)	
		NN' dicarboéthoxy "	R = CH_3-CH_2-OOC-		(0)	
		NN' dicarbo isobutyloxy "	R = $(CH_3)_2-CH-OOC-$		(0)	
		NN' dicarbo benzyloxy "	R = $C_6H_5-CH_2-OOC-$		(100) (20)	
		L lysyl- L lysine	$H_2N-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-NH-(CH_2)_4-CH(NH_2)-COOH$		(2)	
		N ε p toluène sulfonyl L lysyl - L lysine	$CH_3-C_6H_4-SO_3^- \; H_3\overset{+}{N}-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-NH-(CH_2)_4-CH(NH_2)-COOH$		(2)	
		NN' dicarbobenzyloxy L lysyl N ε carbobenzyloxy L lysine	R = $C_6H_5-CH_2-OOC-$	$RHN-(CH_2)_4-CH(NHR)-CO-NR-(CH_2)_4-CH(NH_2)-COOH$	(2000) (rien)	
		N α benzoyl L lysine	R = C_6H_5CO-	$H_2N-(CH_2)_4-CH(NHR)-COOH$	(40)	
		NN' benzoyl L lysine	"	$RHN-(CH_2)_4-CH(NHR)-COOH$	(10)	
		butylate de N α benzoyl L lysine	"	$H_2N(CH_2)_4-CH(NHR)-COOC_4H_9$	(80)	
120	1963 YAMAMURA et col.	di lauroyl L lysine	R = $CH_3-(CH_2)_{10}-CO-$	$RHN-(CH_2)_4-CH(NHR)-COOH$	(2000)	temps de lyse après injection in vivo/ lapins
		di myristoyl L lysine	R = $CH_3-(CH_2)_{12}-CO-$	"		

TABLEAU II - (suite)

Réf.	Auteurs	Composés		Activité [x]	Grandeur mesurée
121	1968 SKOZA et col.	acide amino-6 caproïque	$H_2N - (CH_2)_5 COOH$	(100)	concentration pour inhibition de 50 % de la lyse d'un caillot artificiel
		lysine	$H_2N - (CH_2)_4 - CH (NH_2) - COOH$	(1)	
		acétyl lysine	$CH_3 - CO - NH - (CH_2)_4 - CH (NH_2) - COOH$	(60)	
		glycyl lysine	$H_2N - CH_2 - CO - NH - (CH_2)_4 - CH (NH_2) - COOH$	(25)	
		alanyl lysine	$H_2N - (CH_2)_2 - CO-NH - (CH_2)_4 - CH (NH_2) - COOH$	(10)	
		lysyl glycine	$H_2N - (CH_2)_4 - CH (NH_2) - CO - NH - CH_2 - COOH$	(1)	
122	1972. FUJII et col.	N∝ glycyl L lysine	$H_2N - (CH_2)_4 - CH (NH) - COOH$ (CO) $- (CH_2)_n - NH_2$ n = 1	(10)	temps de lyse d'un caillot artificiel
		N∝ alanyl L lysine	n = 2	(35)	
		N∝ amino-4 butyryl L lysine	n = 3	(45)	
		N∝ amino-5 valéryl L lysine	n = 4	(50)	
		N∝ amino-6 caproïc L lysine	n = 5	(65)	

x Voir note page 30

TABLEAU III - DERIVES CYCLIQUES DES TYPES PAMBA ET AMCHA

Réf.	Auteurs	Composés	Activité [x]	Grandeurs mesurées
110 et 125	1961 MARKWARDT et col.	acide amino-6 caproïque	(100)	temps de lyse d'un caillot de plasma et temps de lyse d'un caillot d'euglobulines.
		acide amino-4 benzoïque	(1)	
		acide aminométhyl-4 benzoïque PAMBA	(500)	
		acide amino-4 phényl acétique	(1)	
		acide aminoéthyl-4 benzoïque	(5)	
		acide aminométhyl-4 phényl acétique	(10)	
		acide aminométhyl-4 benzène sulfonamide	(10)	
		acide amino-4 benzène sulfonamide	(1)	
		acide amino-4 cyclohexane carboxylique	(1)	
		acide aminométhyl-4 cyclohexane carboxylique AMCHA	(400)	
		acide amino-4 cyclohexane acétique	(15)	
		acide aminoéthyl-4 cyclohexane carboxylique	(30)	
		acide aminométhyl-4 cyclohexane acétique	(40)	
111 et 125	1964 MARKWARDT et col.	acide amino-6 caproïque	100	temps de lyse d'un caillot de plasma + essais in vivo / chien
		acide aminométhyl-4 benzoïque PAMBA	400	
		aminométhyl-4 benzoate d'éthyle	30	
		acide N acétyl aminométhyl-4 benzoïque	0	
		acide N carbamoyl aminométhyl-4 benzoïque	0	
		acide hydroxy-2 aminométhyl-4 benzoïque	140	
		acide nitro-3 aminométhyl-4 benzoïque	200	
		aminométhyl-4 benzamide	25	
123	1966 MARKWARDT et col.	acide aminométhyl-4 benzoïque PAMBA	400	temps de lyse d'un caillot de plasma + essais in vivo/ chien
		chlorhydrates d'esters du PAMBA	8	
			4	
			30, 10	
			60	
			20	
			4	
			40	
			120	
		chlorhydrate de l'hydroxy-2 aminométhyl-4 benzoate de butyle	100	
		chlorhydrate du nitro-3 aminométhyl-4 benzoate d'éthyle	10	
		ester dibenzylique de la dibenzylamine dicarboxylique-4, 4'	4	

TABLEAU III - (suite)

Réf.	Auteurs	Composés	Activité *	grandeurs mesurées
107	1968 OKAMOTO et col.	acide amino-6 caproïque	100	surface de lyse sur plateaux de fibrine
		acide amino-4 benzoïque	0	
		acide amino-4 phényl acétique	0	
		acide aminométhyl-4 benzoïque PAMBA	500	
		acide aminométhyl-2 benzoïque	4	
		acide aminoéthyl-2 benzoïque	2	
		acide aminoéthyl-4 benzoïque	50	
		acide aminométhyl-4 benzène sulfonique	80	
		acide aminométhyl-4 salicylique	120	
		dérivés soufrés de l'acide benzoïque	tous < 1	
		acide amino-4 cyclohexane carboxylique	5	
		acide amino-4 cyclohexane acétique	25	
		acide aminométhyl-4 cyclohexane carboxylique (trans) AMCHA	1000	
		acide aminométhyl-2 cyclohexane carboxylique	40	
		acide aminoéthyl-2 cyclohexane carboxylique	80	
		acide aminoéthyl-4 cyclohexane carboxylique	10	
		acide hydroxy-2 aminométhyl-4 cyclohexane carboxylique	400	
121 et 124	1968 et 1969 SKOZA et col.	acide amino-6 caproïque	(100)	concentration d'un activateur de la lyse (streptokinase, plasmine) dont l'effet sur un caillot artificiel est inhibé à 50 %.
		acide aminométhyl-4 benzoïque	(430)	
		acide aminométhyl-4 cyclohexane carboxylique	(3000)	
		acide aminométhyl-4 benzène sulfonique	(600)	
		acide amino-4 phényl acétique	(1)	
		acide amino-4 cyclohexane acétique	(10)	
126	1964 MANGYO	acide aminométhyl-4 benzoïque PAMBA	> (100)	temps de lyse d'un caillot artificiel
		acide aminométhyl-4 salicylique		
		acide aminométhyl-4 cyclohexane carboxylique AMCHA		
		acide hydroxy-2 aminométhyl-4 cyclohexane carboxylique		
127	1963 MARWARD et col.	acide aminométhyl-4 benzoïque PAMBA		effet synergique avec un inhibiteur naturel
128	1972 MAKI et col.	chlorhydrate du trans aminométhyl-4 cyclohexane carboxylate de (carboxyéthyl-2)-4 phényle		

* Voir note page 30

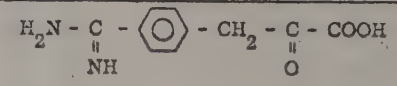
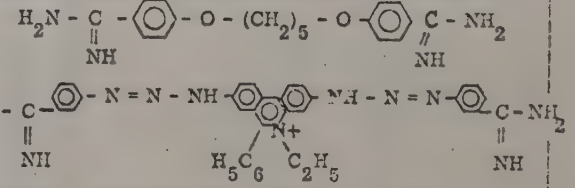
TABLEAU IV - DERIVES BICYCLIQUES

Réf.	Auteurs	Composés	Distance **	Activité *	Grandeur mesurée
132	1969	AEAC $H_2N-(CH_2)_5-COOH$	6,3	100	pourcentage de lyse d'un caillot plasmatique
133	1970	PAMBA $H_2N-H_2C-C_6H_4-COOH$	5,87	370	
134	1972	AMCHA trans $H_2N-H_2C-C_6H_{10}-COOH$	5,82	1030	
	BAUMGARTEN et col.	AMCHA cis	4,6	0	
		Dérivé bicyclo heptane-2,2,1 $H_2N-H_2C-C_7H_{10}-COOH$	5,34	500	
		Dérivés bicyclo nonane-3,2,2 $H_2N-H_2C-C_9H_{14}-COOH$	5,76	1900	
		$H_2N-C_9H_{14}-COOH$	4,22	0	
		Dérivés bicyclo octane-2,2,2 $H_2N-H_2C-C_8H_{12}-COOH$	5,67	10300	
		$H_2N-H_2C-C_8H_{12}-COOH$	5,76	3700	
		$H_2N-H_2C-C_8H_{11}O-COOH$	5,67	1500	
		$H_2N-H_2C-C_8H_{11}O-COOH$	5,67	0	
		$H_2N-HC(CH_3)-C_8H_{12}-COOH$	5,67	7800	
		$H_2N-C_6H_4-COOH$	4,13	0	
		$H_2N-C_6H_4-CH_2-COOH$	4,80	0	
		$H_2N-H_2C-C_6H_4-CH_2-COOH$	6,4	1700	
		acide amino méthyl-4 cubane carboxylique $H_2N-H_2C-C_8H_7-COOH$	5,76	500	
		Dérivés spiro heptane-3,3 $H_2N-C_7H_{10}-COOH$	5,3	0	
		$H_2N-CH_2-C_7H_{10}-COOH$	6,3	0	
135 136	1970 WATANABE et col.	acide amino méthyl-4 décaline carboxylique $H_2N-CH_2-C_{10}H_{16}-COOH$			

* Voir note page 30

** Distance en Å entre le C carboxylique et le C porteur de la fonction amine.

TABLEAU V - COMPOSES POSSEDANT UN GROUPEMENT AMIDINE

Réf.	Auteurs	Composés	Activité *	Grandeur mesurée
137 138	1970 MARKWARDT et col.	acide amidino-4 phényl pyruvique 	antifibrinolytique et anticoagulant	in vivo + temps de lyse d'un caillot de plasma. étude thrombodiastographique
140 141	1970 1971 GERATZ	pentamidine 	1000	temps de lyse d'un caillot plasmatique

* Voir note page 30

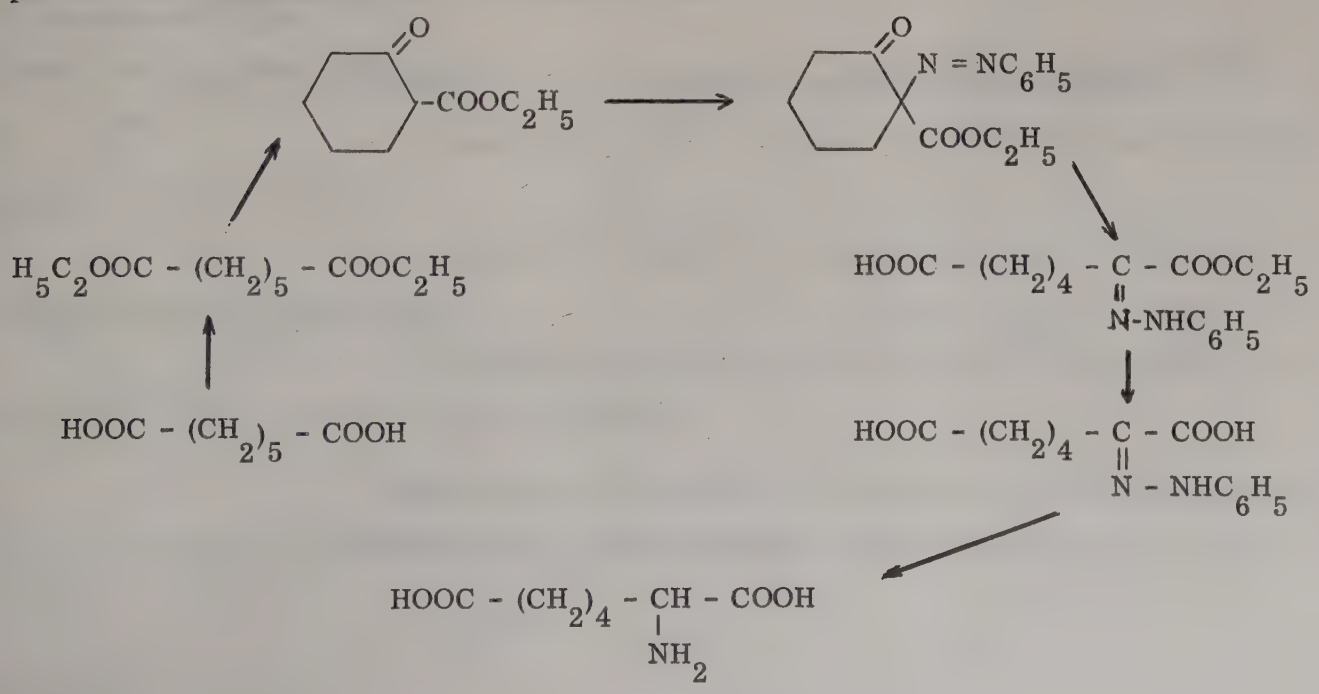
CHAPITRE II

SYNTHESE DE L'ACIDE dl AMINO-2 PIMELIQUE

L'acide dl amino-2 pimélique a été formé au cours de plusieurs réactions, mais pour sa synthèse il n'existe que deux voies commodes, partant toutes deux de l'acide dl pimélique.

1° - Préparation par l'intermédiaire de la phénylhydrazone de l'acide céto-2 pimélique

Cette préparation a été proposée en 1937 par R. P. LINSTEAD et col. (151) et reprise en 1957 par R. WADE et col. (152). Les différentes étapes de cette préparation peuvent être rassemblées sur le schéma suivant :



La transformation de l'acide pimélique en pimélate de diéthyle, décrite par A.I. VOGEL (153) utilise le procédé classique d'un long reflux du mélange acide pimélique-éthanol dans du benzène en présence d'acide sulfurique concentré.

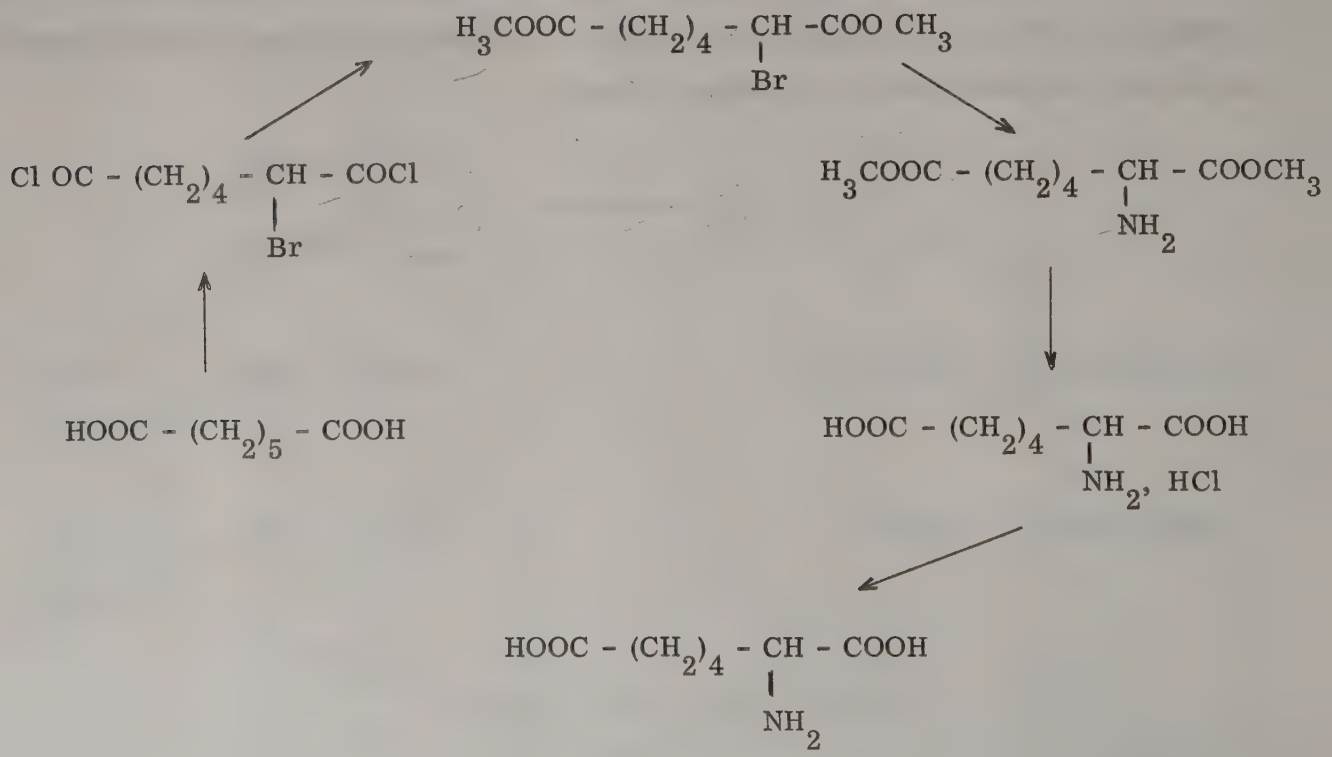
La cyclisation en éthylecarboxylate-1 cyclohexanone résulte d'une condensation de DIECKMANN, qui sous l'action du sodium, conduit à des cétones cycliques ; les conditions de W. DIECKMANN (154) ont été modifiées par M.E. DOBSON et col. (155).

La formation de la phénylhydrazone du monoester de l'acide céto-2 pimélique, décrite par R.H. MANSKE et col. (156, 157) et par R.P. LINSTEAD et col. (151), s'effectue selon une réaction de JAPP et KLINGEMANN : couplage du chlorure de benzène diazonium sur un méthylène actif, puis à l'hydrolyse, dans ce cas, ouverture du cycle.

Par saponification puis acidification on forme ensuite la phénylhydrazone de l'acide céto-2 pimélique (151, 152). La réduction par action du zinc en milieu acétique conduit enfin à l'acide dl amino-2 pimélique (152).

2° - Préparation par l'intermédiaire du diester méthylique de l'acide bromo-2 pimélique

Cette préparation qui s'appuie sur un résultat de B. TEICHMANN (158) a été proposée en 1965 par M. AUGUSTIN (159). Les différentes étapes peuvent être rassemblées sur le schéma suivant :



L'acide pimélique est transformé en dichlorure de l'acide bromo-2 pimélique par action successive de chlorure de thionyle et de brome. En faisant agir le méthanol chaud on forme le diester méthylique correspondant. Ce composé est maintenu à 65° pendant six jours dans un autoclave contenant de l'éthanol saturé d'ammoniac ; on obtient le diester méthylique de l'acide amino-2 pimélique. Par acidification on prépare l'acide amino-2 pimélique sous forme de chlorhydrate ; l'aminoacide est déplacé de son chlorhydrate par action de l'aniline.

3° - Méthode adoptée et caractérisation du composé obtenu

Nous avons suivi la deuxième voie, proposée par M. AUGUSTIN (159), qui nous semble plus simple du point de vue expérimental car, parmi les composés intermédiaires, seul le diester méthylique de l'acide bromo-2 pimélique, doit être isolé.

La caractérisation du composé obtenu F = 220° (lit. 220 - 222°) a été confirmée par une étude spectrale :

- Le spectre infra-rouge présente dans la région 1400 - 1700 cm^{-1} un ensemble de bandes que l'on peut, en première approximation, attribuer de la façon suivante :

. les bandes à 1420 et 1510 cm^{-1} caractérisent les 2 vibrations de valence ν_{COO^-} du groupement COO^- de la forme "zwitterion" de l'acide aminé

. les bandes à 1580 et 1640 cm^{-1} représentent deux vibrations de déformation $\delta_{NH_3^+}$.

. la bande à 1670 cm^{-1} correspond à la vibration de valence $\nu_{C=0}$ du groupement COOH.

- Le spectre R.M.N. enregistré dans l'eau lourde présente

. un massif de 1,30 à 1,90 ppm qui correspond aux protons des groupes CH_2 de la chaîne,

. un triplet à 2,35 ppm dû aux 2 protons du bout de chaîne au voisinage de la fonction acide,

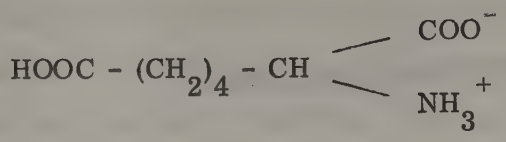
. un triplet à 3,68 ppm dû au proton CH du carbone porteur à la fois d'une fonction acide et d'une fonction amine.

L'intégration de ces différents signaux est en accord avec le rapport : 1 proton CH, 6 protons CH_2 de la chaîne, 2 protons CH_2 au voisinage de la fonction acide.

- L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

	C	H	N	O
% calculés pour $C_7H_{13}NO_4$	48	7,43	8	36,57
% trouvés	47,27	7,19	8,17	36,58

L'ensemble de ces données permet de conclure que nous avons bien préparé l'acide dl amino-2 pimélique, vraisemblablement sous la forme :



Chapitre II - PARTIE EXPERIMENTALE

1° - Préparation du diester éthylique de l'acide dl bromo-2 pimélique

28 g d'acide dl pimélique et 40 ml de chlorure de thionyle fraichement distillé sur huile de lin sont chauffés au reflux pendant 2 h. Après refroidissement on ajoute goutte à goutte 5,3 ml de brome (pour faciliter le démarrage de la réaction dès le début de l'addition il est utile de placer au préalable un cristal d'iode dans la solution). Lorsque l'addition est terminée, la solution est abandonnée pendant 10 h environ, puis elle est versée avec précaution et sous agitation dans 150 ml de méthanol absolu ; l'agitation est maintenue pendant 2 h. Le tout est alors versé dans 150 ml d'eau et l'ester forme la couche inférieure. L'ensemble de la solution est extraite par 3 fois 50 ml d'éther. La phase éthérée est lavée à l'eau, puis par une solution 2N de bicarbonate de sodium, puis encore à l'eau ; elle est séchée sur sulfate de sodium puis distillée sous pression réduite. On recueille 18 g $Eb_{1,5}$ = 125 - 135° de diester éthylique de l'acide dl bromo-2 pimélique (Rdt = 40 %).

2° - Préparation de l'acide dl amino-2 pimélique

Dans un autoclave de 250 cm^3, qui contient 200 ml d'éthanol absolu saturé d'ammoniac par un long barbotage de gaz, on place 9 g de diester éthylique de l'acide dl bromo-2 pimélique. L'autoclave est alors maintenu à 65° pendant 6 jours. Après refroidissement, la solution contenue dans l'autoclave est évaporée à sec sous pression réduite ; le résidu est repris dans 25 ml d'eau additionnée de 10 ml d'acide chlorhydrique concentré, puis on chauffe au reflux pendant 4 h. La nouvelle solution est évaporée à sec sous pression réduite, le résidu est repris dans 25 ml d'eau chaude, la solution est filtrée à chaud. Après refroidissement, 3,5 g d'aniline sont ajoutés goutte à goutte à la solution qui est ensuite épuisée par 2 fois 25 ml d'éther. La phase aqueuse est concentrée sous pression réduite et par addition d'éthanol absolu on recueille 3,2 g de cristaux blancs F = 220° (après recristallisation dans un mélange alcool-eau en quantités égales) d'acide dl amino-2 pimélique (Rdt = 55 %).

CHAPITRE III

ESSAI DE SYNTHESE DE LA N(HYDROXYMALONYL)* ETHYLENE DIAMINE

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - \underset{H}{N} - \underset{O}{C} - CH_2 - COOH$$

Ce composé, à notre connaissance, n'a pas été décrit, ni sous forme libre, ni sous forme de chlorhydrate ou d'autre sel.

Nous avons envisagé de le préparer par action du chlorure d'éthoxymalonyle sur l'éthylène diamine en supposant que l'éthylène diamine, en présence d'un défaut de chlorure d'acide, n'interviendrait que par une de ses fonctions amine ; une réaction de ce type a été observée en particulier vis à vis de la fonction ester par A.J. HILL et col. (160) et par F.B. ZIENTY (161).

1° - Préparation du chlorure d'éthoxymalonyle

Le malonate d'éthyle est tout d'abord transformé en sel de potassium du monoester éthylique de l'acide malonique, puis en malonate acide d'éthyle (162, 163). En faisant agir le chlorure de thionyle sur le sel de potassium (164) ou sur le malonate acide

*Remarque : Par analogie avec l'expression "éthoxymalonyle" qui est généralement adoptée pour désigner le groupement - CO - CH_2 - $COOC_2H_5$, nous adoptons, pour des raisons de commodité, l'expression "hydroxymalonyle" pour désigner le groupement - CO - CH_2 - COOH.

d'éthyle (162, 163), on prépare le chlorure d'éthoxymalonyle.

2° - Action du chlorure d'éthoxymalonyle sur l'éthylène diamine (Préparation de la NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine)

Nous avons effectué un très grand nombre d'essais en faisant varier :

- les quantités relatives des réactifs
- le solvant (éther, tétrahydrofuranne)
- le mode d'extraction à partir du milieu réactionnel

Dans tous les cas la réaction est vive, bien qu'effectuée à 0°. Il se forme un précipité pulvérulent si les réactifs sont employés mole à mole (deux fonctions amine pour une fonction chlorure d'acide), ou pâteux si l'amine est en excès.

D'après l'étude des spectres infra-rouge ou de R.M.N., ce précipité (F = 170° environ) ne semble pas avoir une structure parfaitement définie ; en essayant de le faire cristalliser nous avons observé le phénomène suivant : lorsque la solution de ce produit dans l'eau est abandonnée pendant quelques heures, il se forme une certaine quantité de cristaux incolores F = 130° qui demeure pratiquement constante, mais si on les isole et si l'on abandonne à nouveau la solution, il se forme une nouvelle quantité des mêmes cristaux qui demeure encore pratiquement constante. Ceci peut être répété encore deux ou trois fois et finalement on recueille sous cette forme de cristaux F = 130° les deux tiers en poids des produits de départ employés mole à mole.

Le résidu, recristallisé, donne naissance à de très fins cristaux blancs qui se décomposent avant fusion.

a) Les cristaux F = 130° ont été identifiés de la façon suivante :

- Le spectre infra-rouge présente un ensemble de bandes caractéristiques de la fonction amide :

. à 1560 cm^{-1} la bande qui caractérise la vibration de déformation δ_{NH} du groupement amidique ou bande "amide II",

. à 1635 cm^{-1} la bande qui correspond à la vibration de valence $\nu_{C=0}$ d'un amide,

. à 3100 cm^{-1} et à 3300 cm^{-1} les bandes correspondant respectivement aux vibrations de valence ν_{NH}, "amide B" et "amide A".

On note également à 1735 cm^{-1} la forte bande $\nu_{C=0}$ caractéristique d'un groupement ester.

- Le spectre R.M.N. du produit en solution dans le chloroforme deutérié présente

. centré à 1,29 ppm le triplet, et centré à 4,22 ppm le quadruplet caractéristiques du groupement éthyle,

. à 3,31 ppm un pic ayant l'allure d'un singulet et de 3,35 à 3,50 ppm un multiplet. Pour interpréter ces différents pics nous avons à nouveau enregistré le spectre après avoir ajouté dans la solution, de l'eau lourde et des traces de pyridine pour catalyser un éventuel échange entre protons et atomes de deutérium ; l'échange se produit et le nouveau spectre présente un singulet à 3,31 ppm et un singulet à 3,47 ppm.

L'intégration des différents pics du spectre indique que chaque singulet est caractéristique de deux protons lorsque le groupement éthyle est pris pour référence.

Ces différents renseignements nous suggèrent que les cristaux F = 130° sont constitués d'un modèle moléculaire comportant un groupement éthyle, une fonction amide et deux groupements CH_2 de types différents.

Compte tenu des produits mis à réagir, il s'agit vraisemblablement du composé ayant pour formule :

$$H_5C_2OOC - CH_2 - CO - NH - CH_2 - CH_2 - NH - CO - CH_2 - COOC_2H_5$$

qui permet d'interpréter l'observation R.M.N. : l'échange avec l'eau lourde fait disparaître le proton NH et le couplage du CH_2 malonique avec ce NH disparaît ; le multiplet devient singulet.

- L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

	C	H	N	O
% calculés pour $C_{12}H_{20}N_2O_6$	50,00	6,95	9,72	33,33
% trouvés	49,53	6,88	9,75	33,84

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que nous avons bien préparé la NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine

$$H_5C_2OOC - CH_2 - CO - NH - CH_2 - CH_2 - NH - CO - CH_2 - COOC_2H_5$$

qui jusqu'ici, à notre connaissance, n'avait pas été décrite.

b) Le composé difficilement fusible recueilli en fin d'extraction fait penser au dichlorhydrate d'éthylène diamine (182).

Pour vérifier cette hypothèse nous avons effectué

- un dosage gravimétrique du chlore :

% calculé pour $H_2N - CH_2 - CH_2 - NH_2$, 2 HCl	53,4
% trouvé	52,8

- un spectre R.M.N. du produit en solution dans l'eau lourde qui présente un seul signal : un singulet à 3,31 ppm correspondant aux protons CH_2 de l'éthylène diamine.

c) En conclusion, au cours de cette réaction, malgré le sens de l'addition et les proportions des réactifs employés, nous n'avons pas isolé le produit souhaité, c'est-à-dire celui qui résulterait de la réaction avec une seule des deux fonctions amine de l'éthylène diamine. Cependant, pour le précipité F = 170°, isolé en premier lieu, il semble raisonnable d'avancer l'hypothèse suivante :

Bien qu'il ne soit pas exclu que soit déjà formée une petite quantité de NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine, ce précipité est pour la plus grande part constitué par le chlorhydrate du composé souhaité

$$H_5C_2OOC - CH_2 - CO - NH - CH_2 - CH_2 - NH_2, HCl$$

Lors de sa solubilisation dans l'eau, il est le siège d'une dismutation conduisant au composé finalement isolé, la NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine.

$$2\ H_5C_2OOC - CH_2 - CO - NH - CH_2 - CH_2 - NH_2, HCl \longrightarrow$$
$$\longrightarrow H_5C_2OOC - CH_2 - CO - NH - CH_2 - CH_2 - NH - CO - CH_2 - COOC_2H_5$$
$$+ HCl, H_2N - CH_2 - CH_2 - NH_2, HCl$$

Une telle réaction est vraisemblablement lente et limitée par la réaction inverse et ceci peut expliquer le phénomène que nous avons observé : l'équilibre entre une quantité de produit F = 170° en solution et une quantité de NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine cristallisée est déplacé lorsqu'on isole les cristaux formés et s'établit à nouveau et ainsi de suite.

Nos nombreuses tentatives faites pour caractériser ou isoler une autre substance que la NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine ont échoué.

3° - Préparation de la NN' bis (hydroxymalonyl) éthylène diamine

Par action sur le composé précédent, de la potasse alcoolique à température ordinaire, on prépare facilement le sel de potassium. L'acidification par l'acide chlorhy-

drique conduit à un mélange du composé organique et du chlorure de potassium ; le composé organique, soluble dans l'eau, est difficilement isolé avec un bon rendement. Une méthode satisfaisante consiste à traiter le sel de potassium par une résine échangeuse d'ions qui permet d'obtenir une solution aqueuse d'un produit F = 165° (après évaporation et recristallisation dans l'alcool).

Nous avons identifié ce composé par :

- Le spectre infra-rouge qui présente :

. à 1555 cm^{-1} la bande caractéristique de la vibration δ_{NH} "amide II",

. à 1615 cm^{-1} la bande que l'on peut attribuer à la vibration $\nu_{C=0}$ d'un amide qui, en général, est observée vers 1650 cm^{-1} ; mais dans notre cas sa position anormalement basse pourrait s'expliquer par une association entre le groupement carbonyle de la fonction amide et les hydrogènes des fonctions acide,

. à 3315 cm^{-1} la bande ν_{NH} amide,

. à 1720 cm^{-1} une forte bande correspondant aux vibrations de valence $\nu_{C=0}$.

- Le spectre R.M.N. d'une solution dans le diméthyl sulfoxyde D_6 qui présente :

. un signal à 3,14 ppm correspondant à plusieurs types de protons ; vrai semblablement différents groupements CH_2,

. un large pic à 8,05 ppm qui peut être attribué à des protons NH d'un groupement amidique,

. un massif très applati vers 12 ppm correspondant au proton acide carboxylique.

L'intégration de ces différents signaux montre que pour un proton acide il existe un proton amide et quatre protons du type CH_2.

- L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

	C	H	N	O
% calculés pour $C_8H_{12}N_2O_6$	41,35	5,17	12,08	41,35
% trouvés	41,10	5,22	12,11	41,29

L'ensemble des résultats ci-dessus nous permet de conclure que nous avons bien préparé la NN' bis (hydroxymalonyl) éthylène diamine

$$HOOC - CH_2 - CO - NH - CH_2 - CH_2 - NH - CO - CH_2 - COOH$$

qui jusqu'ici, à notre connaissance, n'avait pas été décrite.

Remarque : On obtient le même composé si l'on traite de la même façon, non plus la NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine, mais le précipité directement isolé du milieu réactionnel.

Chapitre III - PARTIE EXPERIMENTALE

1° - Préparation du chlorure d'éthoxymalonyle

- Une solution de 28 g de potasse dans 250 ml d'éthanol absolu est ajoutée goutte à goutte à une solution agitée de 80 g de malonate d'éthyle dans 250 ml d'éthanol absolu. Il se forme un précipité. Lorsque l'addition est terminée, la solution est chauffée à 75° pendant 1/4 h ; on vérifie que tout le précipité est alors solubilisé, sinon on filtre à chaud et élimine le produit insoluble. Pendant le retour à température normale il se forme 67 g (80 %) de paillettes blanches du sel monopotassique que l'on isole par essorage.

- Une solution de 40 g de sel monopotassique dans 25 ml d'eau est refroidie à 0°. 20 g d'acide chlorhydrique concentré sont ajoutés goutte à goutte. Le précipité de chlorure de potassium formé est isolé par filtration puis la solution est agitée deux fois en présence de 50 ml d'éther puis décantée. La solution éthérée est séchée, le solvant évaporé. Par distillation ($Eb_{0,25}$ = 96°), on recueille 27 g (85 %) de malonate acide d'éthyle.

- A 13,2 g de malonate acide d'éthyle, on ajoute par petites quantités 11,9 g de chlorure de thionyle fraîchement distillé, sur huile de lin. Puis on élève progressivement la température à 60° ; on la maintient pendant 12 h environ. On vérifie que le dégagement de gaz chlorhydrique est terminé et que le milieu réactionnel a subi une perte de poids de 10 g. Le liquide jaune clair restant est du chlorure d'éthoxymalonyle pratiquement pur (I. R.) avec un rendement quasi quantitatif. Une distillation (Eb_{25} = 76°) permet d'obtenir un produit incolore, mais sous l'effet du chauffage il se forme un résidu marron indistillable qui diminue le rendement d'environ 30 %.

2° - Préparation de la NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine

a) Action du chlorure d'éthoxymalonyle sur l'éthylène diamine (en proportion 1/1)

- Une solution de 4,5 g de chlorure d'éthoxymalonyle dans 10 ml d'éther anhydre, maintenue à 0°, est versée goutte à goutte sur une solution de 1,8 g d'éthylène diamine dans 10 ml d'éther anhydre, maintenue à 0°. L'addition de chaque goutte est accompagnée d'un crépitement et entraîne la formation d'un précipité qui est isolé par filtration puis lavé à l'éther anhydre et séché. On recueille 5,7 g de produit pulvérulent F = 170° environ.

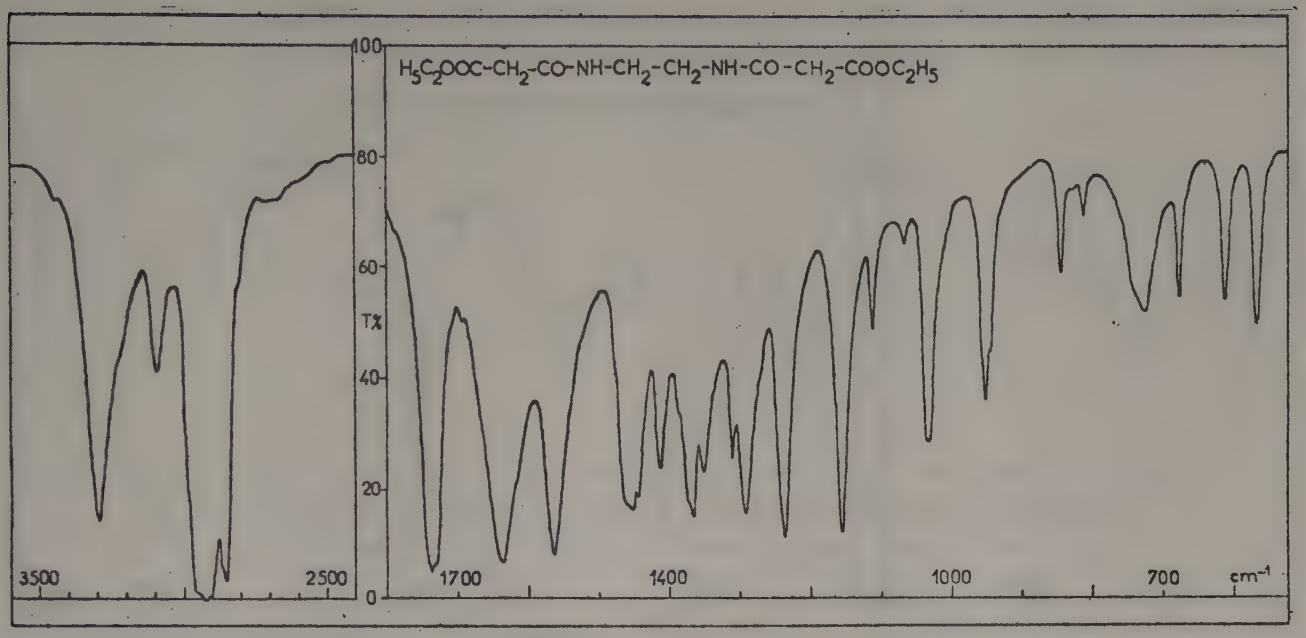
- Ce produit est solubilisé dans le minimum d'eau tiède puis après refroidissement il se forme de petits cristaux parallélépipèdiques incolores F = 130°. Il s'en forme de nouveaux au fur et à mesure que sont isolés ceux déjà formés. Finalement on recueille 4,05 g de NN'bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine (Rendement quasi quantitatif par rapport au chlorure d'éthoxymalonyle).

b) Action de l'éthylène diamine sur le chlorure d'éthoxymalonyle (en proportion 1/2)

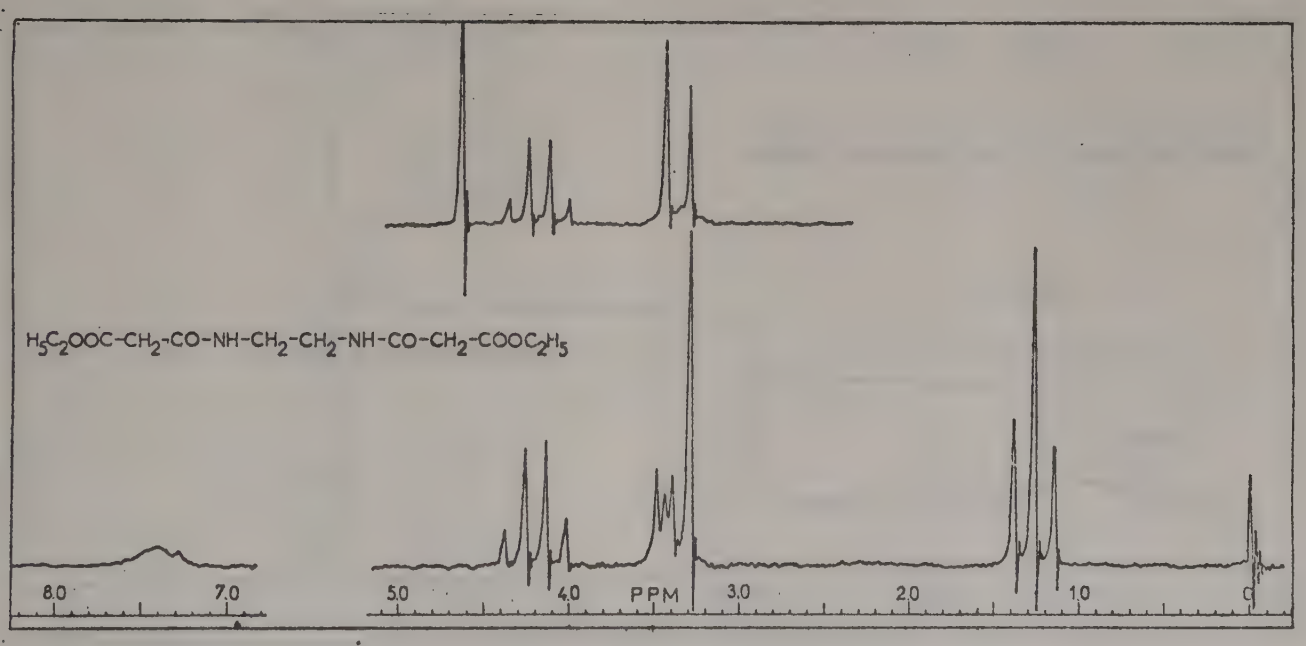
Une solution de 1,8 g d'éthylène diamine dans 10 ml d'éther anhydre est ajoutée à une solution de 9 g de chlorure d'éthoxymalonyle dans 20 ml d'éther anhydre maintenu à 0°. La réactivité des composés se manifeste comme dans la réaction décrite ci-dessus et l'on recueille 10,1 g de précipité qui, repris en solution aqueuse donne naissance à 8,5 g de cristaux incolores F = 130° de NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine.

3° - Préparation de la NN' bis (hydroxymalonyl) éthylène diamine

2,9 g de NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine sont ajoutés à une solution de 1,2 g de potasse dans 20 ml d'éthanol absolu. Le mélange hétérogène est agité et maintenu à 40° pendant 10 à 12 h. Le milieu reste hétérogène ; par filtration on recueille 2,3 g de fins cristaux blancs F = 250° (décomp.) de sel de potassium. 1 g de ce sel est dissous dans l'eau et mis au contact de 40 g de résine échangeuse d'ions DOWEX 50 préalablement acidifiée. Après évaporation de la solution à sec, le résidu pulvérulent est repris par un minimum d'alcool chaud et abandonné à une lente évaporation ; on recueille 0,4 g de fins cristaux légèrement jaunes F = 165° de NN' bis (hydroxymalonyl) éthylène diamine.

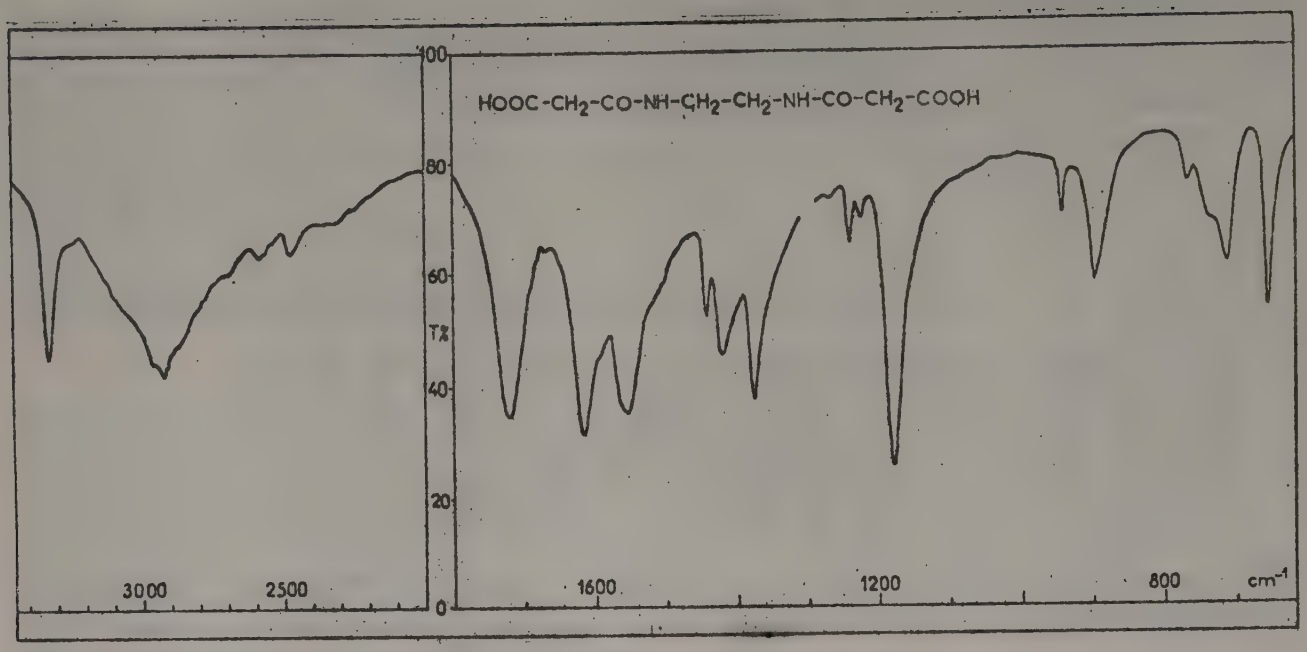


Spectre Infra-rouge (Nujol)



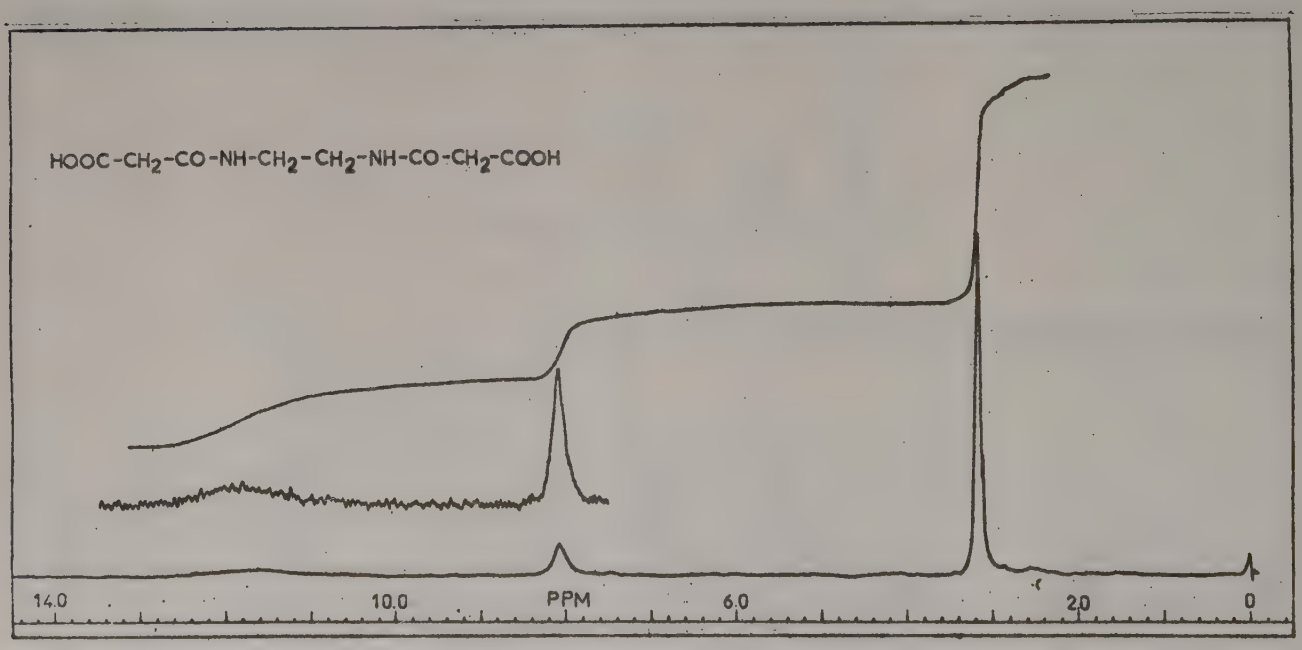
Spectre RMN ($DCCl_3$)

N N' bis (ETHOXYMALONYL) ETHYLENE DIAMINE



Spectre Infra-rouge

(Nujol 650 à 1300 cm^{-1} et Fluorolube 1300 à 3400 cm^{-1})



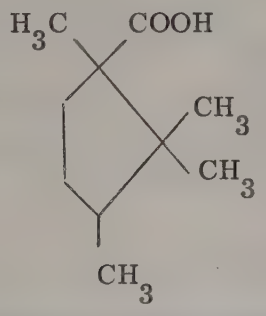
Spectre RMN (DMSO D_6)

N N' bis (HYDROXYMALONYL) ETHYLENE DIAMINE

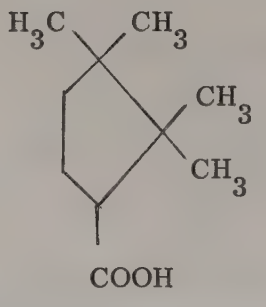
CHAPITRE IV

SYNTHESES DES ACIDES AMINOCAMPHOLIQUES

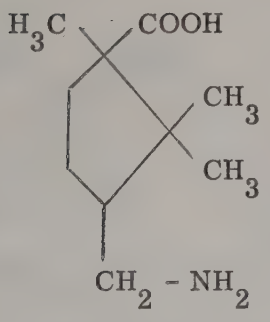
Aux deux formes isomères de l'acide campholique correspondent des acides aminés qui ont été étudiés au début du siècle.



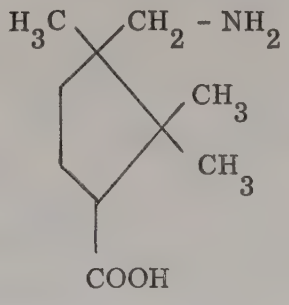
acide ∝ campholique



acide β campholique



acide ∝ aminocampholique

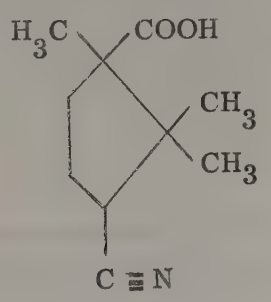


acide β aminocampholique

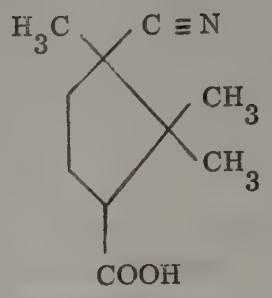
Le composé ∝ a tout d'abord été signalé en 1896 par ODDO et col. (165). La synthèse des composés ∝ et β a été effectuée par H. RUPE et col. (168) et par

W.A. NOYES et col. (169, 170). En 1927 F. SALMON-LEGAGNEUR (171) reprenait la préparation du composé ∝. A notre connaissance, depuis cette date, la littérature ne mentionne plus les acides aminocampholiques.

Les auteurs précités avaient obtenu ces composés par réduction des mononitriles des acides ∝ et β camphoriques :

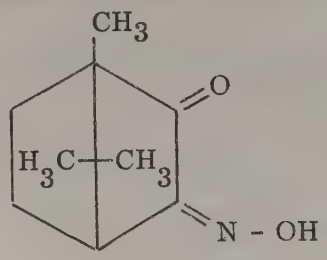


mononitrile de l'acide ∝ camphorique



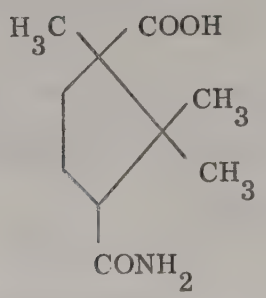
mononitrile de l'acide β camphorique

Le nitrile ∝ a tout d'abord été obtenu par ODDO et col. (165) et par A. HALLER et col. (166) à partir de l'isonitrosocamphre.

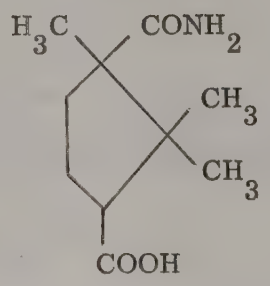


isonitrosocamphre

Puis les nitriles ∝ et β ont été préparés par S. HOOGEWERFF et col.(167) à partir des composés amidiques correspondants, les acides ∝ et β camphoramiques.



acide ∝ camphoramique



acide β camphoramique

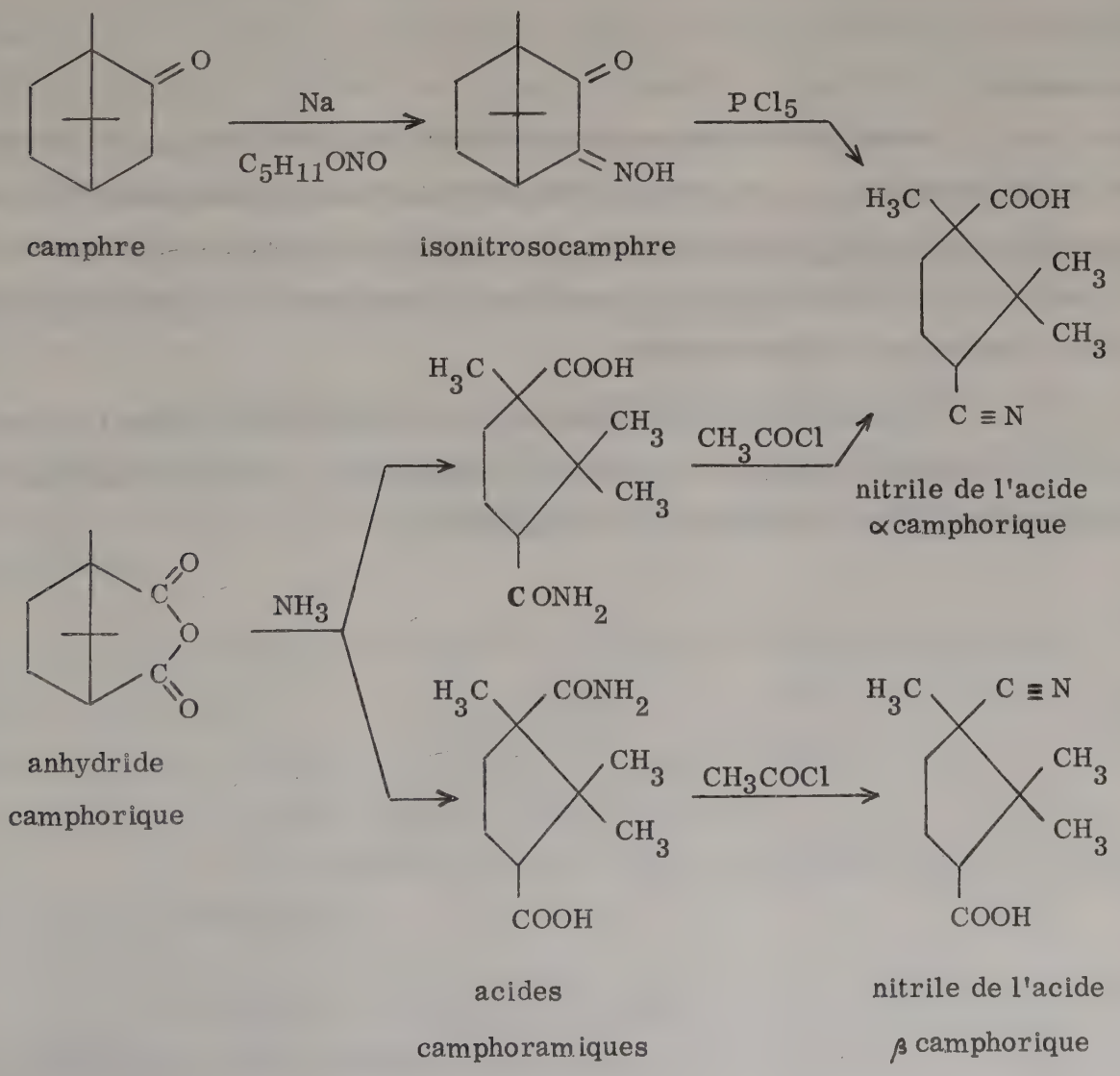
Ces composés résultaient de l'action de l'ammoniac sur l'anhydride camphorique mais la réaction conduisait à un mélange des deux isomères.

Ensuite H. RUPE et col. (168) ont préféré le procédé à l'isonitrosocamphre pour préparer le composé α et le procédé à l'acide camphoramique pour préparer le composé β , tandis que W.A. NOYES et col. (169, 170) reprenaient la méthode de S. HOOGEWERFF pour préparer les deux nitriles.

Enfin F. SALMON-LEGAGNEUR (171) retenait le passage par l'isonitrosocamphre pour obtenir le composé α .

Il faut surtout noter que, par ces deux voies de synthèse il semble difficile de parvenir à de bons rendements, car la plupart des auteurs précités signalent qu'en reprenant les conditions opératoires de leurs prédécesseurs ils ne purent reproduire les résultats annoncés, mais que leur propre mise au point de la réaction permet de les retrouver ou même de les améliorer.

En résumé les préparations des nitriles que l'on peut envisager se schématisent par les étapes suivantes :



La préparation du nitrile β implique le passage par l'acide camphoramique correspondant.

Pour le nitrile α seulement, deux voies semblent possibles, mais le choix a priori reste difficile, car des travaux auxquels on peut se référer, et qui remontent à plus de cinquante ans, il ne se dégage pas nettement l'avantage de l'une de ces deux voies sur l'autre.

Nous avons donc entrepris de reproduire les différentes transformations ci-dessus.

Remarque :

Aucune démonstration n'a été effectuée mais il est admis que les nitriles des acides camphoriques, préparés à partir de l'anhydride camphorique ou de l'isonitrosocamphre, qui est vraisemblablement le siège d'un phénomène de tautomérie, sont des isomères CIS. La réduction qui permet de les transformer en acides aminocamphoriques conserve cette stéréoisomérie.

Cependant les auteurs précités avaient l'habitude de ne pas faire précéder du mot CIS le nom de chacun de ces composés. Nous suivons cette habitude, mais il est sous-entendu que nous considérons des isomères CIS.

I - SYNTHESE PAR L'INTERMEDIAIRE DES ACIDES CAMPHORAMIQUES

1° - Préparation des acides camphoramiques

La réaction de l'anhydride camphorique et de l'ammoniac gazeux ou en solution conduit à la fois aux deux isomères α et β de l'acide camphoramique.

S. HOOGEWERFF et col. (167) qui les premiers avaient étudié cette réaction pensaient qu'un seul des deux isomères donnait lieu à la formation d'un chlorhydrate et voyaient là le moyen d'effectuer la séparation.

H. RUPE et col. (168) ainsi que W.A. NOYES et col. (169) notaient plutôt la différence de solubilité des sels alcalins des acides α et β camphoramiques et tiraient de là le principe de la méthode de séparation :

L'ammoniaque est ajoutée à l'anhydride camphorique et la solution est abandonnée. Les cristaux qui se forment sont essentiellement constitués du sel d'ammonium du composé α ; ils sont séparés. De la soude est ajoutée à la solution et après une nouvelle attente il y a formation de cristaux du sel de sodium du composé β. L'acidification permet le passage des sels aux acides camphoramiques.

Nous avons suivi un mode opératoire proche de celui qui a été proposé par ces auteurs (168, 169) en notant toutefois les points suivants :

- Lors de la préparation de la solution d'anhydride camphorique dans l'ammoniaque il n'est pas nécessaire de refroidir, car nous ne traitons que de petites quantités de réactifs et l'élévation de température par rapport à la température ordinaire est négligeable.

- La réaction qui conduit à un mélange des deux sels d'ammonium des acides α et β camphoriques est lente, de même que la précipitation du composé α, moins soluble. Il est donc préférable d'augmenter la durée de la réaction car ainsi

. la quasi totalité de l'anhydride réagit

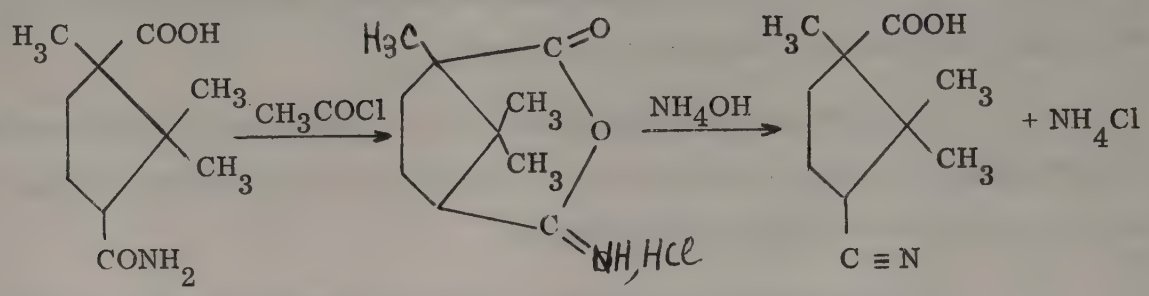
. les composés α et β sont obtenus à un meilleur degré de pureté dès la première cristallisation.

- En opérant de cette façon la formation du composé β est favorisée : alors que H. RUPE et col. (168) recueillaient deux fois plus de dérivé α que de dérivé β, nous

avons obtenu une fois et demie plus de dérivé β que de dérivé α .

2° - Transformation des acides camphoramiques en mononitriles de l'acide camphorique

Cette transformation a été effectuée (167, 168, 169) selon le schéma réactionnel suivant :



Sous l'action du chlorure d'acétyle il se forme un chlorhydrate d'isoimide peu stable qui, traité par l'ammoniaque, conduit au nitrile de l'acide camphorique.

En opérant selon les procédés déjà décrits par ces auteurs, nous avons pu préparer les nitriles α et β de l'acide camphorique, dont nous avons noté les points de fusion :

. celui de l'isomère β est conforme aux données de la littérature.

. celui de l'isomère α est inférieur de 5° à 7° à celui communément admis.

Nous pensons que cet abaissement du point de fusion peut provenir de la présence d'isomère β dans l'isomère α . L'étude en chromatographie gaz-liquide a montré que le temps de rétention du composé α est légèrement supérieur à celui du composé β mais nous n'avons pu séparer suffisament les pics pour doser avec précision la quantité de β qui accompagne en effet le dérivé α mais qui cependant apparaît très faible (< 10 %).

Cette impureté remonte vraisemblablement à la préparation des acides camphoramiques dont l'isomère α ne peut être obtenu débarrassé d'isomère β .

Cela montre que ce mode de préparation des nitriles par l'intermédiaire des composés amidiques est mieux adapté à l'isomère β , obtenu en plus grande quantité et avec une plus grande pureté que le composé α .

Avec des échantillons de nitriles purifiés nous avons effectué une étude des spectres infra-rouge et de résonance magnétique nucléaire.

- En infra-rouge, chaque composé montre un pic à 2230 cm^{-1} qui est caractéristique de la vibration de valence du groupe C ≡ N et la bande à 1700 cm^{-1} est caractéristique de la vibration de valence du vibrateur C = 0 carboxylique.

Les autres bandes d'absorption dues au squelette carboné sont nettement distinctes d'un composé à l'autre, mais n'ont pas été attribuées en détail et l'étude infra-rouge ne permet pas, a priori, de distinguer la forme α de la forme β .

- Les spectres R.M.N. sont beaucoup plus intéressants :

. tout d'abord l'intégration montre que les singulets de 1,2 à 1,3 ppm de déplacement chimique, dus aux groupes méthyle, représentent bien les 9/14 des protons liés aux carbones.

. d'autre part, les différentes valeurs des déplacements chimiques de ces singulets,

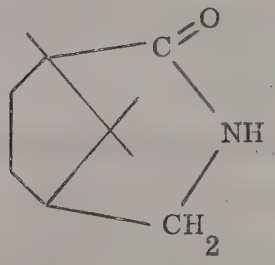
- pour le composé α : 1,18 ; 1,28 ; 1,29 ppm
- pour le composé β : 1,20 ; 1,28 ; 1,37 ppm

permettent d'attribuer les deux singulets de 1,20 et 1,28 ppm aux deux groupes méthyle fixés sur le carbone 2 du cycle pentanique.

Le déplacement chimique observé pour le singulet du troisième méthyle est bien en accord avec les attributions de structures résultant de recoupements chimiques puisqu'on constate que ces protons résonnent à champ plus faible lorsque le groupe méthyle est fixé au carbone porteur du goupe C ≡ N (1,37 ppm) que lorsqu'il est fixé au carbone porteur du groupe COOH (1,29 ppm).

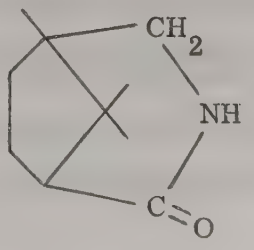
3° - Réduction des nitriles camphoriques en acides aminocampholiques

Les auteurs (165, 168) qui, les premiers, avaient préparé les nitriles de l'acide camphorique, en avaient effectué la réduction par la réaction alcool-sodium qui fut utilisée plus tard (170, 171) bien qu'elle présente l'inconvénient de conduire aussi à la formation d'un composé secondaire, la camphidone (168, 172), qui se forme par réaction intramoléculaire entre la fonction acide et la fonction amine.



α camphidone

β camphidone



La séparation du produit principal fait intervenir une acidification et l'on obtient le chlorhydrate de l'acide aminé, qui par neutralisation, conduit à l'acide aminé lui-même (170).

Ecartant cette méthode, nous avons envisagé la réduction catalytique par la méthode au nickel de RANEY (176) dans l'ammoniaque de A. ALBERT et col. (173) qui fut d'abord mise au point pour la réduction de l'acide cyano-4 benzoïque et qui, depuis, a été souvent employée pour la réduction de nitriles-acides, en particulier lors de la dernière étape de la préparation des acides aminés doués de propriétés antifibrinolytiques (174, 175 parmi de nombreuses références).

Les auteurs cités opéraient à pression et température ordinaires ; nous avons augmenté ces deux paramètres pour favoriser la réduction complète du nitrile mais sans rechercher leurs valeurs minimales. Selon la conduite de l'extraction adoptée, nous avons obtenu le chlorhydrate ou le dihydrate de l'acide aminocampholique.

La caractérisation de ces composés a été effectuée de la façon suivante :

a) Chlorhydrate de l'acide α aminocampholique

Après filtration et évaporation à sec de la solution ammoniacale dans laquelle a eu lieu la réduction, le résidu est repris par une petite quantité d'eau chlorhydrique. Le chlorhydrate qui précipite est souillé de chlorure d'ammonium provenant de l'ammoniac qui n'avait pu être totalement éliminé. Une ou deux recristallisations fractionnées dans l'eau sont nécessaires pour obtenir un produit se décomposant à 250° environ, mais cette purification entraîne une baisse importante du rendement.

- Le spectre infra-rouge de ce composé confirme qu'il n'existe plus aucune trace de nitrile (absence de bande vers 2230 cm^{-1}) et présente à 1700 cm^{-1} la bande caractéristique de la vibration $\nu_{C=0}$ de la fonction carboxylique. Les bandes à 1500 et 1600 cm^{-1} peuvent être attribuées aux vibrations $\delta_{NH_3}+$. Le massif allant de 2700 à 3200 cm^{-1} renferme, outre les vibrations ν_{C-H}, les vibrations $\nu_{NH_3}+$ et ν_{O-H} carboxylique.

- Le spectre R.M.N. de ce composé, uniquement soluble dans l'eau, ne peut être enregistré que dans l'eau lourde et sera suivi d'un échange des protons des fonctions carboxylique et amine et des atomes de deutérium de l'eau lourde. Le spectre ne présentera pas de signal correspondant aux fonctions acide et amine.

- Pour confirmer la structure de ce composé nous avons fait appel à la spectrographie de masse. Sur le spectre nous notons en particulier :

. le pic moléculaire à la masse 185 correspondant à l'acide

α-amino campholique sous forme libre.

. un pic d'intensité comparable à la masse 186 que l'on peut interpréter comme le résultat d'une protonation de la fonction carboxylique par collision ion-molécule, c'est-à-dire répondant à la formule brute $C_{10}H_{20}NO_2$. Toutefois un pic à la même masse pourrait correspondre à un composé de formule brute $C_{10}H_{22}N_2O$. Pour s'assurer qu'une telle hypothèse n'est pas à retenir nous avons déterminé la masse de notre composé par la technique de haute résolution : la valeur trouvée est

186, 14 891

que nous pouvons comparer aux valeurs calculées

pour $C_{10}H_{20}NO_2$: 186, 14 939 et pour $C_{10}H_{22}N_2O$: 186, 17 320

Ces valeurs nous confirment que le pic à la masse 186 correspond bien à la forme protonée de l'acide aminé attendu.

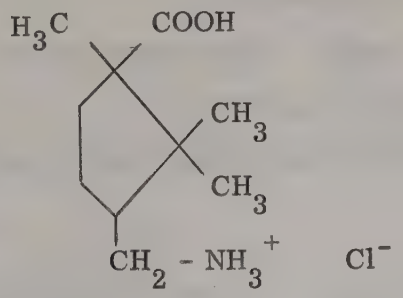
. un pic à la masse 30 d'une intensité très largement supérieure à celle de tous les autres pics du spectre correspond au groupement $-CH_2NH_2^+$ et nous confirme bien la présence du groupement aminométhyle dans notre composé.

. les pics aux masses 167 et 168 qui peuvent s'interpréter à partir du composé envisagé après départ, dans le premier cas, d'une molécule H_2O, et dans le deuxième cas d'un groupement NH_3^+.

- Un dosage de chlore sur un échantillon du produit a donné les résultats suivants :

% calculé pour $C_{10}H_{20}NCl$	16, 05
% trouvé	16, 12

L'ensemble des renseignements recueillis permet de conclure qu'il s'agit bien du chlorhydrate de l'acide α aminocampholique:



b) Dihydrate de l'acide α aminocampholique

Le résidu de l'évaporation à sec de la solution ammoniacale est repris dans un minimum d'eau puis abandonné à une lente cristallisation ; il se forme des cristaux F = 232 - 234°.

Pour l'acide ∝ aminocampholique les températures de fusion étaient plus élevées : 268 - 270° (168) et 300 - 320° (169).

Au cours de la réaction de réduction du nitrile de l'acide ∝ camphorique divers auteurs (165, 168, 170, 172) ont signalé l'obtention de l' ∝ camphidone dont la température de fusion est comprise entre 230 - 231° (165, 168, 170, 172) et 236 - 237° (171) ; nous pouvions craindre que le composé isolé soit l' ∝ camphidone, mais cela ne peut être le cas puisque cette dernière est soluble dans les solvants organiques alors que les cristaux obtenus ne sont pratiquement solubles que dans l'eau.

La détermination de la structure des cristaux obtenus repose sur les éléments suivants :

- Le spectre infra-rouge présente

. les bandes à 1400 et 1560 cm^{-1} qui peuvent être attribuées aux deux vibrations ν_{COO^-} du groupement COO^- de la forme "zwitterion" des acides aminés.

. les bandes à 1535 et 1620 cm^{-1} qui peuvent être caractéristiques de deux des vibrations $\delta_{NH_3^+}$.

. le massif aux environs de 3000 cm^{-1} qui renferme vraisemblablement, outre les vibrations ν_{C-H}, les vibrations $\nu_{NH_3^+}$.

. la bande à 3400 cm^{-1} qui atteste la présence d'eau et la bande à 1650 cm^{-1} qui suggère l'eau de cristallisation.

. on note aussi l'absence de bande dans la région des vibrations de valence du groupement carbonyle (1650 - 1700 cm^{-1}).

- Le spectre R.M.N. de la solution dans l'eau lourde présente

. trois singulets correspondant aux groupements méthyle que l'on peut attribuer de la façon suivante :

le signal à 0,70 ppm et un des signaux à 1,06 - 1,08 ppm caractérisent le groupement gem-diméthyle,

l'autre des signaux vers 1 ppm caractérise le méthyle ∝ -carboxylique.

L'intégration de ces pics représente les 9/16 de l'ensemble des protons non échangés dans l'eau lourde.

. Dans la région des protons du cycle on remarque, centré sur 3 ppm, un multiplet ayant l'allure de la partie AB du système ABX que l'on peut attribuer au groupe CH_2 lié à un carbone du cycle porteur d'un proton.

. L'intégration du pic de l'eau formée à partir de l'échange des 3 protons des fonctions acide et amine, comparée à celle de l'eau déjà présente dans l'eau lourde, fait apparaître que l'échange a concerné pratiquement 7 protons, c'est-à-dire 4 de plus que ceux des fonctions acide et amine. Ce résultat pourrait correspondre à un échange concernant les 3 protons envisagés mais aussi à des protons de molécules d'eau de cristallisation. Les cristaux seraient donc formés de dihydrate de l'acide aminocampholique.

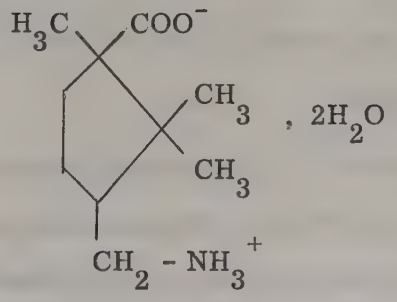
- L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

	C	H	N	O
% calculés pour $C_{10}H_{19}NO_2$, $2H_2O$	54,26	10,40	6,34	29,00
% trouvés	53,82	10,40	6,30	29,16

- L'analyse thermogravimétrique montre que, lorsqu'un échantillon est soumis à une lente élévation de température (50° par heure), il subit une perte de poids qui commence dès 40° et s'arrête à 80°. Cette perte de poids correspond à 2,05 moles d'eau pour une mole de produit anhydre $C_{10}H_{19}NO_2$.

La température de fusion du produit anhydre F = 232 - 234° est la température que nous avons déjà observée à partir de l'hydrate.

Ces différents résultats permettent de conclure que le composé obtenu est le dihydrate de l'acide α aminocampholique dont l'existence, à notre connaissance, n'avait pas été signalée.



Par ailleurs, nous avons déterminé le pouvoir rotatoire absolu d'une solution aqueuse des cristaux obtenus :

$$[\alpha]_D^{24} = +60°,30$$

Si dans le calcul nous faisons intervenir la concentration en acide aminocampholique anhydre, le pouvoir rotatoire absolu a pour valeur :

$$[\alpha]_D^{24} = +71°,94$$

Pour l'acide α aminocampholique préparé par neutralisation du chlorhydrate,

W.A. NOYES et col. (170) avaient observé un pouvoir rotatoire absolu de

$$[\alpha]_D^{26} = +67°$$

Le fait que nous ayons obtenu la cristallisation de ce composé sous forme de dihydrate s'explique vraisemblablement par les conditions de lente évaporation de la solution. Ce phénomène a été plusieurs fois observé lors de la cristallisation d'acides et d'acides ω aminés en particulier.

c) Dihydrate de l'acide β aminocampholique

En réduisant le nitrile de l'acide β camphorique comme il est décrit ci-dessus pour le composé α, on obtient des cristaux F = 228 - 230°. Pour l'acide β aminocampholique, H. RUPE et col. (168) indiquent F = 215 - 220°.

La détermination de la structure du composé obtenu a été conduite comme précédemment et repose sur les éléments suivants :

- Le spectre infra-rouge présente

. des bandes à 1390, 1550 et 1610 cm^{-1} qui peuvent s'interpréter, par analogie avec le composé α précédent, par l'existence du groupement COO^- donnant deux vibrations de valence à 1390 et vers 1550 cm^{-1}, et du groupement NH_3^+ donnant deux vibrations de déformation vers 1550 et à 1610 cm^{-1} (la bande 1550 correspondant à 2 vibrations distinctes).

. le massif vers 2500 - 3000 cm^{-1} qui renferme, outre les vibrations de valence ν_{C-H}, les vibrations de valence $\nu_{NH_3^+}$.

. les bandes à 1660 et 3400 cm^{-1} qui sont en accord avec la présence d'eau de cristallisation.

- Le spectre R.M.N. enregistré dans l'eau lourde,

. confirme la présence dans la molécule de trois groupes méthyle ; les signaux caractéristiques de ces groupements apparaissent avec des déplacements chimiques de 0,76, 1,00 et 1,04 ppm. L'intégration de ces pics représente les 9/16 de l'ensemble des protons non échangés dans l'eau lourde.

. présente un pic à l'allure de singulet à 2,85 ppm, se distinguant des autres signaux des protons du cycle ; son intégration révèle qu'il correspond à deux protons. L'enregistrement avec expansion des échelles de fréquences permet de distinguer la structure fine de ce signal : on observe deux pics d'égale intensité correspondant à la résonance des deux protons en α du carbone asymétrique.

Notons qu'au niveau de ces protons du groupe CH_2 apparaît une différence

fondamentale entre le spectre du composé α et le spectre du composé β, qui permet d'identifier sans ambiguité chacun des deux isomères.

. L'intégration du pic de l'eau formée à partir de l'échange des trois protons des fonctions acide et amine, comparée à celle de l'eau déjà présente dans l'eau lourde, montre que l'échange concerne pratiquement 7 protons, c'est-à-dire 4 de plus que ceux des fonctions acide et amine. Ce résultat, comme dans le cas de l'isomère α est en accord avec la forme dihydrate du composé attendu.

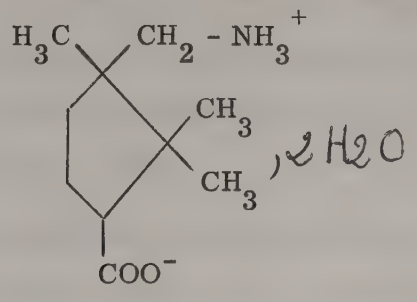
- L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

	C	H	N	O
% calculés pour $C_{10}H_{19}NO_2$, $2H_2O$	54,26	10,40	6,34	29,00
% trouvés	54,16	10,29	6,44	28,83

- L'analyse thermogravimétrique montre que, lorsqu'un échantillon est soumis à une lente élévation de température (50° par heure), il subit une perte de poids qui commence dès la température ordinaire et s'arrête vers 80° ; elle correspond à 2,06 moles d'eau pour une mole de produit anhydre $C_{10}H_{19}NO_2$.

La température de fusion du produit anhydre F = 228 - 230° est celle que nous avons déjà observée à partir de l'hydrate.

Ces différents résultats permettent d'attribuer au composé obtenu la structure du dihydrate de l'acide β aminocampholique.



Par ailleurs nous avons déterminé le pouvoir rotatoire absolu d'une solution aqueuse des cristaux obtenus :

$$\left[\alpha\right]_D^{24} = +15°,82$$

Si dans le calcul nous faisons intervenir la concentration en acide aminocampholique anhydre, le pouvoir rotatoire absolu a pour valeur :

$$\left[\alpha\right]_D^{24} = +18°,87$$

Pour l'acide β aminocampholique préparé par neutralisation du chlorhydrate,

W.A. NOYES et col. (170) avaient observé un pouvoir rotatoire absolu de :

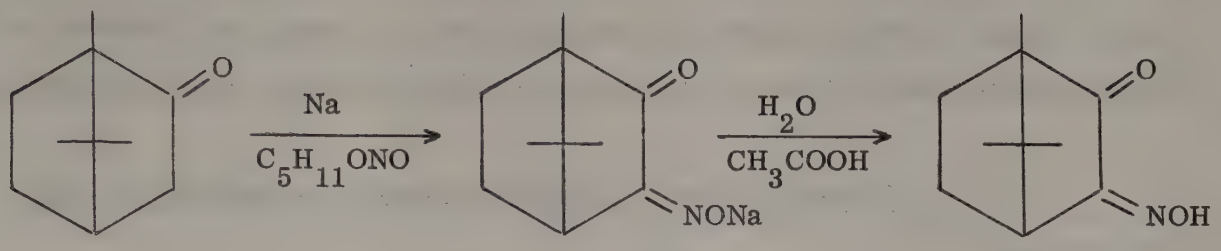
$$[\alpha]_D = +16°,4$$

Le fait que nous ayons obtenu les deux isomères sous la forme de dihydrates confirme que le mode opératoire que nous avons suivi est particulièrement favorable à la préparation des hydrates des acides aminocampholiques.

II - SYNTHESE PAR L'INTERMEDIAIRE DE L'ISONITROSOCAMPHRE

1° - Préparation de l'isonitrosocamphre

Ce composé a été obtenu pour la première fois par L. CLAISEN et col. (177) qui faisaient réagir le sodium, puis le nitrite d'amyle, sur le camphre en solution éthérée.



La réaction fut reprise (168) en remplaçant le nitrite d'amyle par le nitrite d'éthyle, malgré l'inconvénient dû à son état gazeux, puis en remplaçant le sodium par l'amidure de sodium et de potassium (178) ; finalement F. SALMON-LEGAGNEUR (171, 179) retint l'action de l'amidure de sodium sur le camphre en solution dans le toluène et sous atmosphère inerte.

Depuis ces travaux, la préparation de l'isonitrosocamphre n'a plus, à notre connaissance, fait l'objet de nouvelles modifications opératoires. Malgré les détails expérimentaux que donne cet auteur (171) il ne nous a pas été possible de reproduire dans les mêmes conditions la préparation de l'isonitrosocamphre ; nous n'avons pas recherché les causes exactes de cet échec. Une tentative effectuée en remplaçant le nitrite d'amyle par le nitrite d'éthyle, conduisit aussi à un échec dû, à notre avis, à la difficulté d'emploi de ce composé gazeux.

Finalement les réactifs les plus commodes nous ont semblé être ceux initialement proposés par L. CLAISEN et col. (177), c'est-à-dire le sodium et le nitrite d'amyle, en prenant toutefois la précaution d'opérer en atmosphère d'azote.

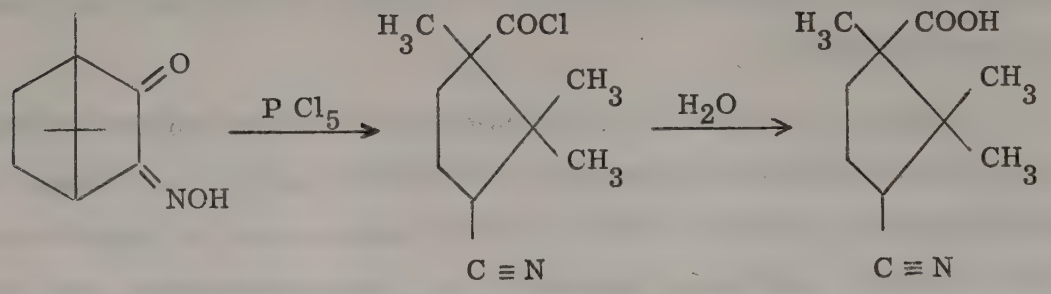
Tous les auteurs qui ont préparé l'isonitrosocamphre ont constaté l'existence de ce composé sous deux formes physiques : L. CLAISEN et col. (177) distinguent une forme stable (F = 153°) et une forme labile (F = 132°) ; M.O. FORSTER (180, 181) isola et identifia la forme stable ou SYN (F = 153°) et la forme labile ou ANTI (F = 114°) ; J. MEISENHEIMER et col. (183) étudièrent aussi ces deux isomères et leur préparation à l'état pur ; F. SALMON-LEGAGNEUR (171) avait aussi noté, comme L. CLAISEN et col. (177), que le produit obtenu a un point de fusion d'environ

130° alors qu'après chauffage pendant quelques mn à 150° et recristallisation dans un mélange méthanol-eau, il apparaît sous la forme stable F = 153 - 154°, mais que l'une ou l'autre des deux formes conduit de façon identique au nitrile de l'acide camphorique. Nous avons constaté des faits similaires.

Au cours de notre expérimentation nous avons aussi noté qu'il était possible d'isoler le dérivé sodé de l'isonitrosocamphre. Nous avons vérifié que lorsque l'isonitrosocamphre est préparé en vue de sa transformation en nitrile, le plus avantageux du point de vue du rendement, est de traiter le "mélange de CLAISEN" (F = 130° environ) comportant à la fois le composé sous la forme instable et sous la forme stable.

2° - Transformation de l'isonitrosocamphre en nitrile de l'acide α camphorique

La préparation du nitrile à partir du camphre isonitrosé a été effectuée par action du chlorure d'acétyle (166) ou par action du pentachlorure de phosphore (165, 168, 183).

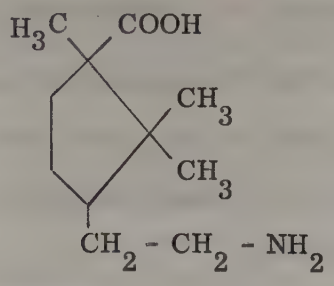


Le chlorure de thionyle a aussi été employé pour la préparation du composé sous forme ester (171).

Nous avons tout d'abord essayé d'utiliser ce réactif, qui présente l'avantage de ne donner que des produits gazeux comme produits secondaires, mais n'avons pu obtenir le nitrile attendu que dans de faibles proportions. Nous avons donc opéré avec le pentachlorure de phosphore ; le nitrile de l'acide α aminocamphorique préparé, a été identifié comme nous l'avons décrit lors de sa préparation à partir de l'acide α camphoramique.

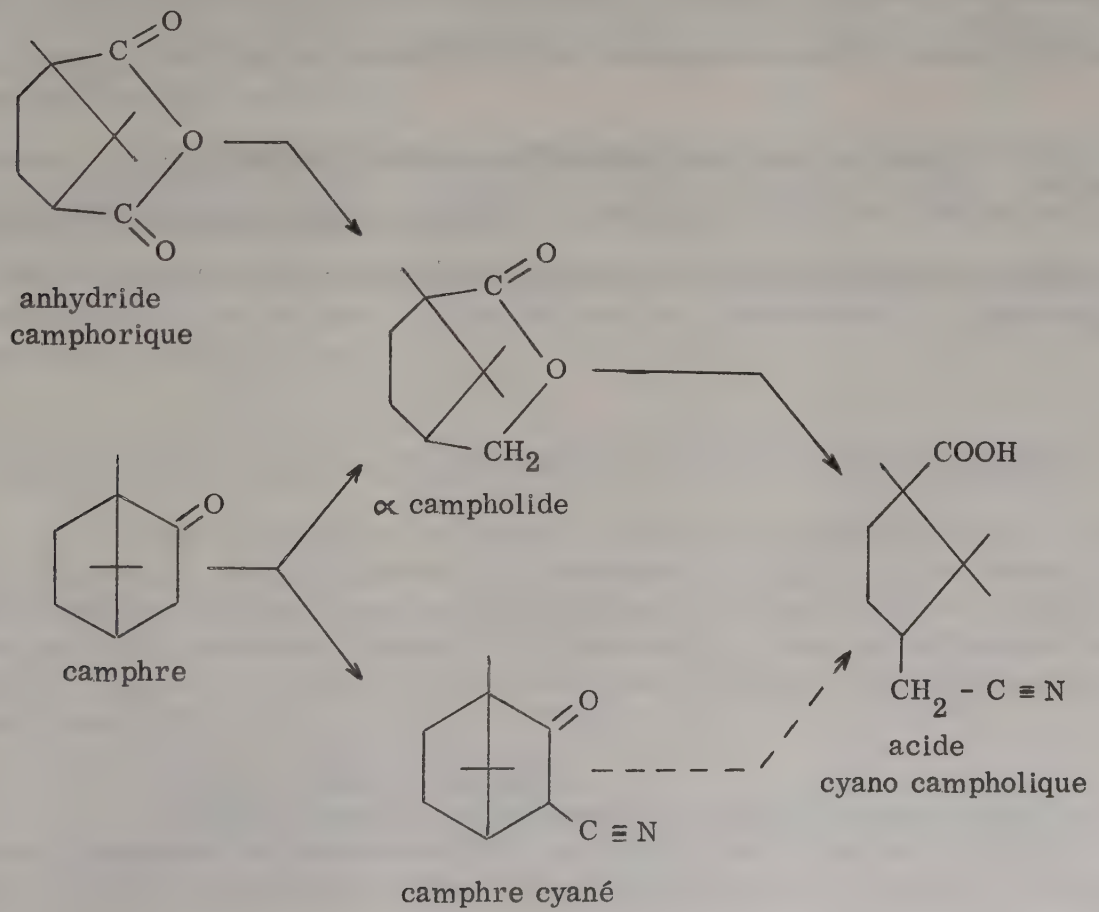
III - APPENDICE. ETUDE DE LA PREPARATION DE L'ACIDE TRIMETHYL-1,2,2 βAMINOETHYL-3 CYCLOPENTANE CARBOXYLIQUE

Nous plaçons ici cette étude compte tenu, de l'analogie de structure qui existe entre ce composé et les acides aminocampholiques, d'une part, et de l'identité des produits qui servent à les préparer, d'autre part.



Acide triméthyl-1,2,2 βaminoéthyl-3 cyclopentane carboxylique

A notre connaissance ce composé n'a pas été décrit, mais on peut, par analogie avec la préparation des acides aminocampholiques, envisager sa préparation par réduction de l'acide cyanocampholique. Les diverses possibilités de synthèse décrites pour ce composé peuvent être résumées sur le schéma suivant :



1° - Préparation à partir de l' ∝campholide

A. HALLER (184) a tout d'abord préparé l' ∝campholide en réduisant l'anhydride camphorique par l'amalgame de sodium, mais avec un rendement de 4 % seulement.

Ce composé a ensuite été obtenu par A. BAEYER et col. (185) à partir du camphre par action de l'acide peracétique. Cette réaction fut reprise plus récemment par R.R. SAUERS (186) qui parvint à un rendement en produit brut de 30 %.

La transformation de l' ∝campholide en acide cyanocampholique nécessite l'action du cyanure de potassium en tube scellé chauffé à 240°. La réaction a été décrite par A. HALLER (187) et plus récemment employée par L. OTVOS et col. (188), mais les rendements sont médiocres.

2° - Préparation à partir du camphre cyané

Cette préparation pourrait paraître plus séduisante : en effet le camphre cyané peut être facilement préparé par action du chlorhydrate d'hydroxylamine (189, 191) mais, si M. MINGUIN (190) décrivit sa transformation en acide cyanocampholique sous l'action de la potasse alcoolique, cette réaction ne put être reproduite par L. PALFRAY (191). Nous ne sommes pas non plus parvenus à la réaliser.

La première voie de synthèse demeure donc possible, mais la médiocrité des rendements et la difficulté de sa mise en œuvre nous ont fait renoncer à l'entreprendre dans le cadre de ce travail orienté vers une éventuelle utilisation biologique ou thérapeutique.

Chapitre IV - PARTIE EXPERIMENTALE

1° - Préparation des acides camphoramiques

60 ml d'ammoniaque concentrée (d = 0, 92) sont ajoutés à 40 g d'anhydride camphorique dans un flacon qui est ensuite bouché. On laisse à la température ordinaire pendant 5 jours environ et on agite de temps en temps.

Les cristaux formés sont séparés et dissous dans 40 ml d'eau qui insolubilisent une faible quantitié d'anhydride n'ayant pas réagi. L'acidification par H Cl N versé goutte à goutte provoque la précipitation de 14 g de cristaux blancs F = 174° d'acide α camphoramique (32 %).

Au filtrat de la première séparation on ajoute une quantité égale d'une solution de soude à 5 % et le mélange est abandonné 2 h. environ tandis que précipitent 28 g de cristaux du sel de sodium du dérivé β, qui sont séparés et solubilisés dans 40 ml d'eau ; l'acidification par H Cl N versé goutte à goutte provoque la précipitation de 20 g de cristaux blancs F = 180° d'acide β camphoramique (45 %).

2° - Transformation des acides camphoramiques en nitriles de l'acide camphorique

26 g de chlorure d'acétyle sont ajoutés à 13 g d'acide α camphoramique qui se solubilisent lentement ; la solution est abandonnée pendant 2 h. environ. Il se forme des cristaux qui sont ensuite séparés par filtration sous pression réduite puis ajoutés par petites quantités à une solution d'environ 30 ml d'ammoniaque concentrée dans 150 ml d'eau, maintenue à 0°. La solution obtenue est filtrée et acidifiée par H Cl N versé goutte à goutte. Il se forme 7 g de cristaux blancs F = 145° du mononitrile de l'acide α camphorique (58 %).

En procédant de même à partir de l'isomère β de l'acide camphoramique on obtient à peu près la même quantité de cristaux blancs F = 109 - 110° du mononitrile de l'acide β camphorique.

La chromatographie gaz-liquide de ces composés en solution dans $HCCl_3$ sur carbowax 20 M, à 150°, sous 1, 6 bar de pression s'effectue avec un temps de rétention de l'ordre de 10 mn.

3° - Réduction du nitrile de l'acide α camphorique en acide α aminocampholique

Dans un autoclave de 125 cm^3 on place 2 g de nitrile de l'acide α camphorique, 40 ml d'eau, 10 ml d'ammoniaque concentrée (d = 0, 92) et 2 g de nickel de Raney. Après fermeture on porte la pression d'hydrogène à 70 kg/cm^2 et l'autoclave est placé sur un appareil à secousses et chauffé à 45° pendant 6 h. Après refroidissement et retour à la pression normale, le nickel est éliminé du mélange réactionnel par filtration sur verre fritté.

- Préparation du chlorhydrate :

La solution aqueuse est soumise à une évaporation sous pression réduite ; le résidu, débarassé de l'ammoniac, est repris par un peu d'eau puis acidifié par une solution d'acide chlorhydrique au demi versée goutte à goutte. La nouvelle solution est

filtrée pour éliminer d'éventuelles traces de nitrile non réduit ; le filtrat est abandonné à une évaporation lente, qui entraîne l'apparition de 1,6 g de cristaux blancs. Après deux recristallisations dans l'eau on recueille 0,5 g de cristaux F = 250° (décomp.) de chlorhydrate d'acide αaminocampholique.

- Préparation du dihydrate :

La solution est complètement évaporée sous pression réduite, le résidu blanc, pulvérulent, est dissous dans un minimum d'eau tiède et la solution est abandonnée à pression et température ordinaires pendant 4 à 7 jours ; on recueille alors 1,7 g de cristaux en forme de longues lamelles incolores F = 232 - 234° (85 %).

4° - Réduction du nitrile de l'acide β camphorique en acide β aminocampholique

Le mélange réactionnel est traité comme dans le cas de la réduction du nitrile de l'acide αcamphorique.

- Préparation du dihydrate :

La solution est évaporée à sec et le résidu blanc est dissous dans un minimum d'eau chaude. A la différence du composé α, le composé β est beaucoup moins soluble dans l'eau et la précipitation a lieu aussitôt la mise en solution ; on recueille alors 1,75 g de cristaux en forme de fines aiguilles incolores F = 228 - 230° (85 %).

5° - Préparation de l'isonitrosocamphre

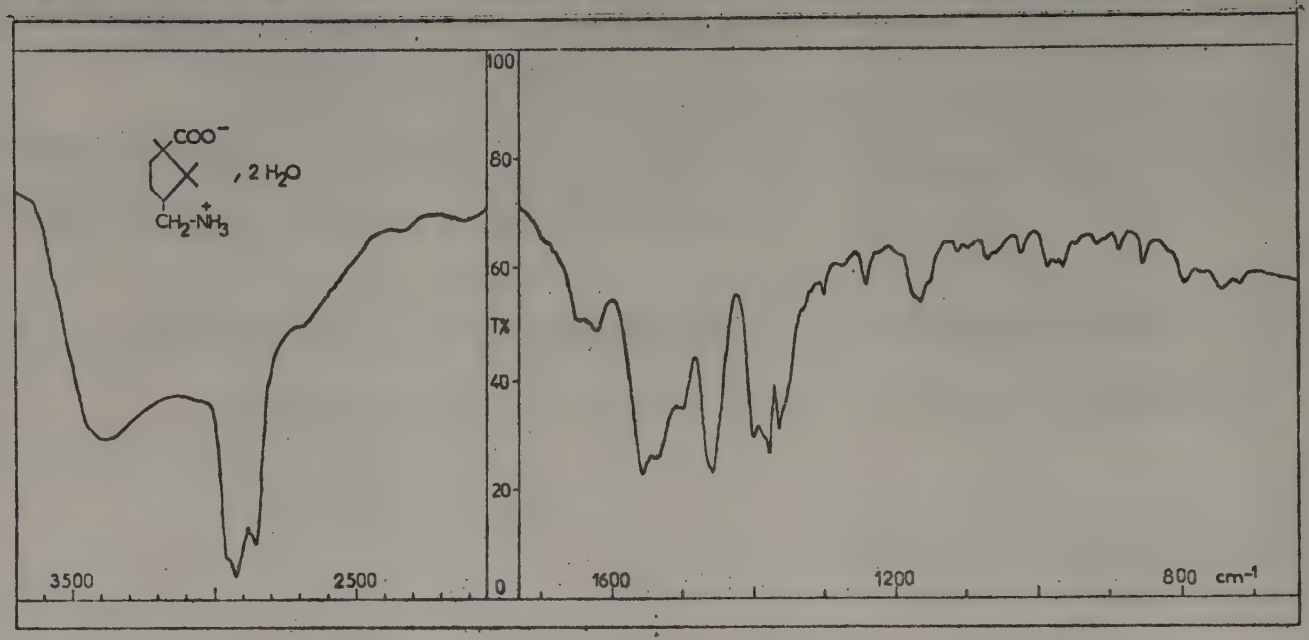
Dans un appareillage isolé de l'atmosphère et préalablement balayé par un courant d'azote on verse une solution de 50 g de camphre dans 250 ml d'éther anhydre qui recouvre 7,6 g de sodium en fils. Le réacteur est plongé dans un bain d'eau glacée, puis on ajoute goutte à goutte, en agitant, 38,5 g de nitrite d'amyle. La solution devient pâteuse et colorée, l'agitation est maintenue pendant le retour à température normale puis la solution est abandonnée pendant 12 h.

Après s'être assuré qu'il ne reste pas de sodium n'ayant pas réagi on verse par petites portions 150 ml d'eau. La solution aqueuse est plusieurs fois épuisée à l'éther ; l'éther dissous est chassé par barbotage d'un courant d'air. La solution aqueuse est alors filtrée, puis neutralisée exactement par une solution d'acide acétique au demi versée goutte à goutte ; cela entraîne la précipitation de 24,9 g de cristaux F = 125° (41 %) constitués par un mélange des deux formes stables et instables de l'isonitrosocamphre. La précipitation commence pendant l'addition de l'acide acétique ; les premiers cristaux qui se forment (6,5 g) sont jaune vif et fondent à 165° ; ils sont constitués par le dérivé sodé de l'isonitrosocamphre. Lors de la recristallisation la solution est acidifiée et la forme sodée est en totalité transformée en isonitrosocamphre.

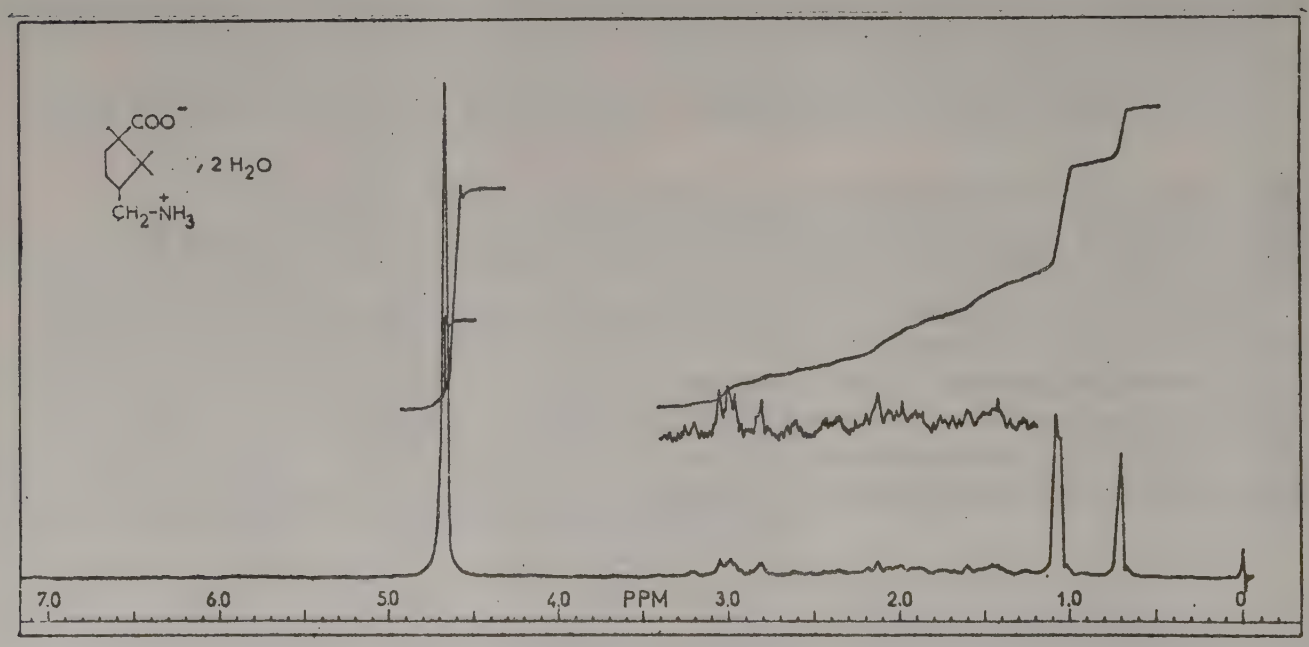
6° - Transformation de l'isonitrosocamphre en nitrile de l'acide αcamphorique

10 g d'isonitrosocamphre sont placés en solution dans 250 ml d'éther anhydre ; 12 g de pentachlorure de phosphore sont ajoutés par petites portions. La solution devient pâteuse et il se produit un dégagement de gaz chlorhydrique ; lorsqu'il est terminé on abandonne la solution pendant 4 à 5 h. puis on refroidit énergiquement le ballon réactionnel avant d'ajouter 150 ml d'eau glacée.

La phase organique est séparée par décantation puis le solvant est évaporé. La pâte résiduelle est solubilisée dans 100 ml d'ammoniaque concentrée puis filtrée. L'acidification par addition d'acide chlorhydrique concentré provoque la précipitation de 4,2 g de fins cristaux blancs F = 145° de nitrile de l'acide ∝camphorique (42 %).

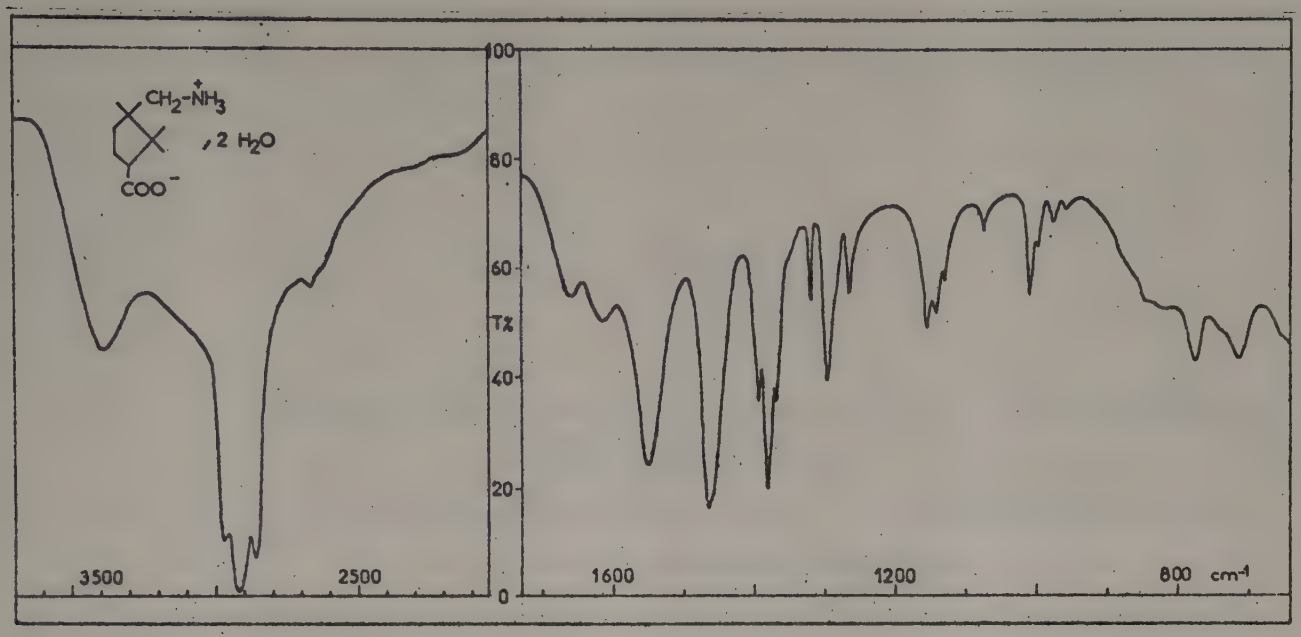


Spectre Infra-rouge (Nujol)

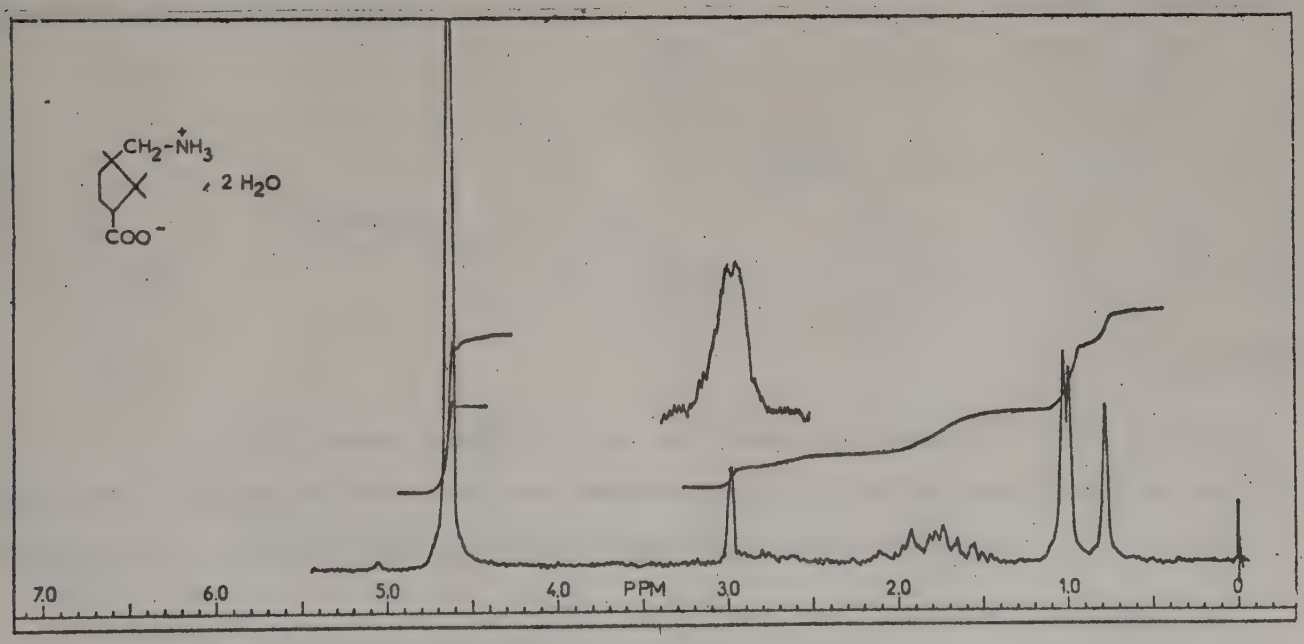


Spectre RMN (D_2O)

ACIDE ∝ AMINO CAMPHOLIQUE, DI HYDRATE



Spectre Infra-rouge (Nujol)



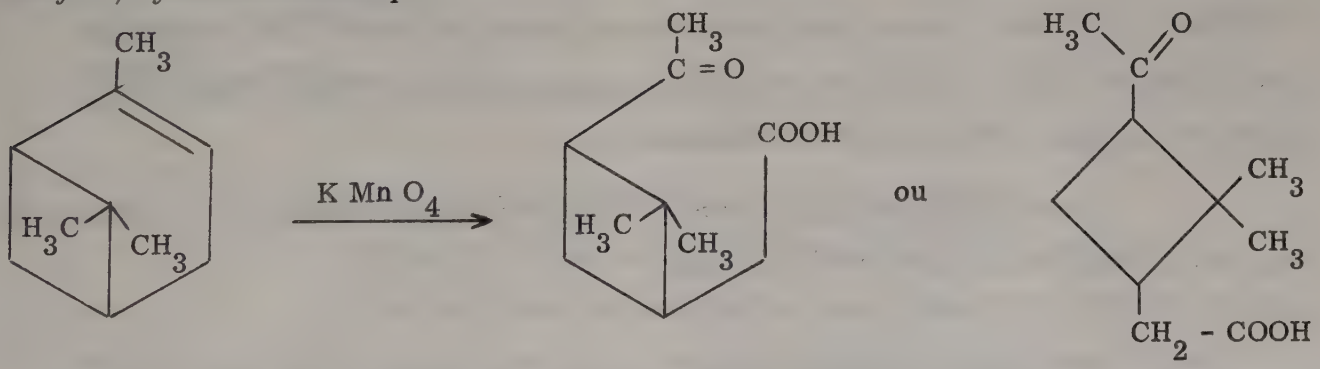
Spectre RMN (D_2O)

ACIDE β AMINO CAMPHOLIQUE, DI HYDRATE

CHAPITRE V

SYNTHESE DE L'ACIDE dl (DIMETHYL-2,2 ∝ AMINOETHYL-3) CYCLOBUTANE ACETIQUE

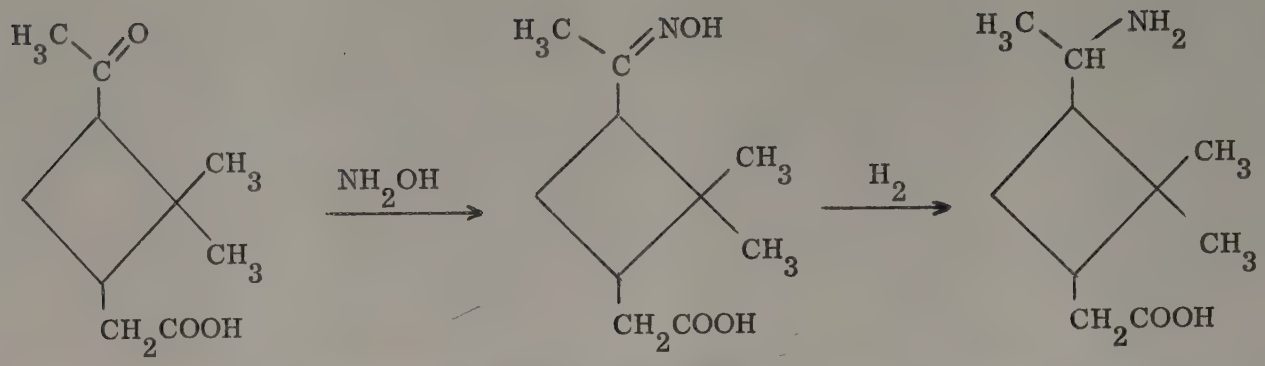
L'oxydation de l' ∝pinène conduit à l'acide pinonique ou acide (diméthyl-2,2 acétyl-3) cyclobutane acétique.



Selon l'orientation des chaînes carbonnées par rapport au cycle cyclobutanique, cet acide peut se présenter sous les formes CIS ou TRANS. Pour chacun de ces isomères, il peut aussi exister deux inverses optiques et un racémique.

Comme l'a montré M. DELEPINE (192), lors de l'oxydation permanganique, c'est l'acide pinonique sous forme CIS que l'on obtient et son isomérisation en forme TRANS peut être provoquée par acidification du milieu.

La fonction cétone peut être transformée en oxime qui, par réduction, peut conduire à la fonction amine primaire, c'est-à-dire à l'acide (diméthyl-2,2 ∝aminoéthyl-3) cyclobutane acétique.



Ce type de transformation fonctionnelle cétone-oxime-amine a fait l'objet de nombreux travaux. Dans le cas particulier de l'acide pinonique elle a tout d'abord été réalisée par G. GALLAS et col. (193), puis a été étudiée d'une façon très complète en 1950 par M. HARISPE et col. (194). Ces derniers auteurs ont effectué la réduction des oximes des formes d, l, et dl de l'acide cis pinonique en employant soit le sodium et l'alcool, soit l'hydrogène et un catalyseur. Ils ont constaté que le sodium et l'alcool conduisent à l'aminoacide sous forme TRANS, alors que la réduction catalytique conduit à la forme CIS. Les rendements sont d'environ 50 %.

Depuis lors, seule, la transformation de l'acide dl cis pinonique en acide aminé correspondant a fait l'objet de publications en 1968-1970 ; l'équipe russe de F. AVOTINS a tout d'abord essayé divers catalyseurs de l'hydrogénation de l'oxime (195, 196, 197), puis a réalisé une hydramination directe de l'acide sous l'action de formamide ou d'urée (198). Ni les nouveaux catalyseurs, ni ce dernier procédé original, n'ont permis d'améliorer le rendement.

Sur le plan pratique, la méthode par réduction de l'oxime, déjà largement employée, nous semble devoir être retenue.

1° - Préparation de l'oxime

L'oxime de l'acide dl cis pinonique, F = 150° (199) à 152° (192), est facilement préparée par la réaction habituelle au chlorhydrate d'hydroxylamine dont LE VAN THOI (199) a décrit le mode opératoire.

2° - Réduction de l'oxime

a) par le sodium et l'alcool

Un premier essai dans les conditions habituelles : alcool absolu et sodium, a donné un mélange pâteux à partir duquel nous n'avons pas pu isoler le produit de la réduction.

Nous avons alors repris le mode opératoire faisant appel à l'alcool isoamylique en milieu xylénique, utilisé avec un très bon rendement par M. HARISPE et col. (194).

Dans le cas de l'acide dl, bien qu'avec un moins bon rendement, nous avons pu obtenir le chlorhydrate de l'acide aminé attendu, F = 260° qui, d'après les derniers auteurs, se présente avec la structure TRANS. Nous n'avons pas vérifié cette opinion ni essayé de préparer l'aminoacide libre à partir du chlorhydrate.

b) par hydrogénation catalytique

La réduction de l'oxime par cette voie a été réalisée dans des conditions expérimentales variées sur lesquelles nous possédons les renseignements suivants :

catalyseur	solvant	pression	température	rendement	référence
Ni Raney	éthanol	100 kg/cm^2	60°	58 %	194
Ni Raney	ammoniaque	50 kg/cm^2	80°	65 % brut	194
Ni Raney	acide acétique	50 kg/cm^2	80°	45 %	194
Pt Vavon	acide acétique	1 kg/cm^2	20°	69 %	194
(Al, Ni, Ti)	méthanol			41 %	195, 196
Ni Raney	éthanol			22 %	197

Parmi les différentes possibilités, nous avons retenu :

- Le nickel de Raney, de préparation facile et peu onéreuse.
- Les conditions opératoires que nous avions déjà adoptées lors de la réduction des nitriles des acides α et β aminocamphoriques, mais avec l'alcool saturé d'ammoniac comme solvant.

En conservant aussi la même technique pour l'extraction du produit de la réduction, nous avons pu préparer directement l'acide aminé libre CIS (F = 255°) ; mais ce composé est très soluble dans l'eau et son obtention à l'état pur avec un bon rendement est difficile. Par contre, par acidification, on peut recueillir le chlorhydrate (F = 260°) avec un bon rendement (68 %) comparativement aux essais antérieurs.

Les températures de fusion sont en accord avec les valeurs données par M. HARISPE et col. (194). Nous avons cependant confirmé l'identification des composés obtenus de la façon suivante :

- Chlorhydrate de l'acide dl cis(diméthyl-2,2 ∝aminoéthyl-3) cyclobutane acétique

- Le spectre infra-rouge présente :

. deux bandes à 1520 et 1610 cm^{-1} caractéristiques de deux des trois vibrations de déformation $\delta_{NH_3^+}$.

. le massif de 2500 à 3200 cm^{-1} qui renferme, entre autre, les trois vibrations de valence $\nu_{NH_3^+}$.

. la petite bande à 2000 cm^{-1} qui correspond vraisemblablement à une combinaison $\nu_{NH_3^+}$ et $t_{NH_3^+}$ rencontrée dans ce type de composés.

. la bande très intense à 1708 cm^{-1} qui caractérise la vibration de valence $\nu_{C=0}$ de la fonction carboxylique.

- Le spectre R.M.N. enregistré dans l'eau lourde présente :

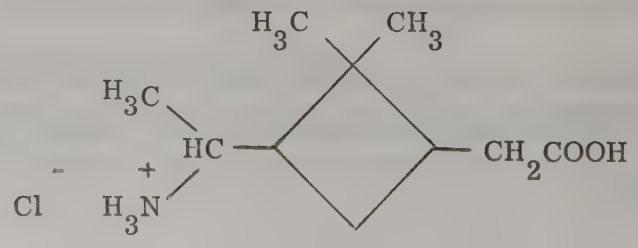
. Deux singulets à 1,37 et 1,48 ppm qui correspondent aux deux groupes méthyle fixés sur le cycle butanique (les deux autres pics dans cette région constituent un doublet centré à 1,5 ppm correspondant au troisième méthyle fixé sur le CH voisin du cycle). L'intégration montre que les protons correspondant à l'ensemble de ces signaux représentent bien les 9/16 des protons du squelette de la molécule.

. le massif vers 3,70 ppm qui correspond au proton du CH, porteur du groupe NH_3^+, qui est déblindé par la proximité du N^+.

- L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

	C	H	N	O	Cl
% calculés pour $C_{10}H_{19}NO_2$, HCl	54,17	8,57	6,32	14,44	16,03
% trouvés	53,89	8,59	6,32	14,47	15,95

L'ensemble de ces renseignements nous permet de conclure que nous avons bien préparé le chlorhydrate de l'acide dl cis (diméthyl-2,2 ∝aminoéthyl-3) cyclobutane acétique.



- Acide dl cis (diméthyl-2, 2 ∝aminoéthyl-3) cyclobutane acétique

- Le spectre infra-rouge présente :

. Deux bandes à 1530 et 1620 cm^{-1} qui peuvent, par analogie avec le chlorhydrate, être attribuées aux vibrations de déformation $\delta_{NH_3^+}$. (Les vibrations de valence de ce groupement se situent dans le massif vers 2500 - 3000 cm^{-1} et la combinaison $\nu_{NH_3^+}$, $t_{NH_3^+}$ apparaît à 2180 cm^{-1}).

. les bandes à 1385 et 1570 cm^{-1} qui correspondent aux deux vibrations de valence ν_{COO^-} du groupement carboxylique sous la forme "zwitterion" de l'aminoacide.

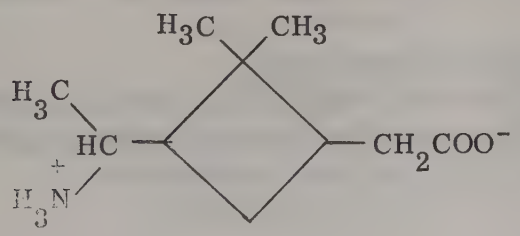
. On remarque l'absence de bandes qui traduisent la présence d'eau.

- Le spectre R.M.N. enregistré dans l'eau lourde ne se distingue pas nettement de celui du chlorhydrate ; l'intégration du pic de l'eau formée par échange des trois protons des fonctions acide et amine, comparée à celle de l'eau déjà présente dans l'eau lourde, fait apparaître en effet que l'échange a concerné trois protons. La présence d'eau de cristallisation semble donc exclue.

- L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

	C	H	N	O
% calculés pour $C_{10}H_{19}NO_2$	64,90	10,25	7,56	17,30
% trouvés	64,36	9,89	7,55	18,12

De l'ensemble de ces données nous concluons que nous avons bien isolé l'acide dl cis (diméthyl-2,2 ∝aminoéthyl-3) cyclobutane acétique.



Remarque : Alors que les acides aminocampholiques cristallisent facilement dans l'eau sous forme de dihydrates, cet aminoacide cristallise difficilement, mais sous forme libre.

Chapitre V - PARTIE EXPERIMENTALE

1° - Préparation de l'oxime de l'acide d l cis pinonique

Une solution de 4, 5 g de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 10 ml d'eau est ajoutée à 10 g d'acide d l cis pinonique en solution dans 25 ml d'eau. 5 g de carbonate de sodium sont ensuite ajoutés sous agitation ; le mélange est abandonné pendant 1 à 2 h. Il s'est alors formé une masse visqueuse partiellement cristallisée, qui est isolée, puis solubilisée dans l'éther. La solution est séchée, évaporée, et la substance reprise par l'alcool méthylique. Par évaporation il se forme 8, 4 g (Rdt78 %) de cristaux, F = 150°, d'oxime.

2° - Préparation de l'acide d l trans (diméthyl-2, 2 ∝aminoéthyl-3) cyclobutane acétique

A une solution de 5 g d'oxime dans 25 ml d'alcool isoamylique on ajoute 50 ml de xylène, puis 4, 8 g de sodium par petites portions et en agitant. Après la fin de la réaction et retour à la température normale, on ajoute de l'acide chlorhydrique en quantité correspondante à l'alcoolate de sodium. De l'eau est ajoutée jusqu'à obtention de deux couches, puis la solution xylénique est décantée et, par acidification, libère 2, 1 g (Rdt 45 %) de cristaux blancs F = 260° de chlorhydrate de l'aminoacide.

3° - Préparation de l'acide d l cis (diméthyl-2, 2 ∝aminoéthyl-3) cyclobutane acétique

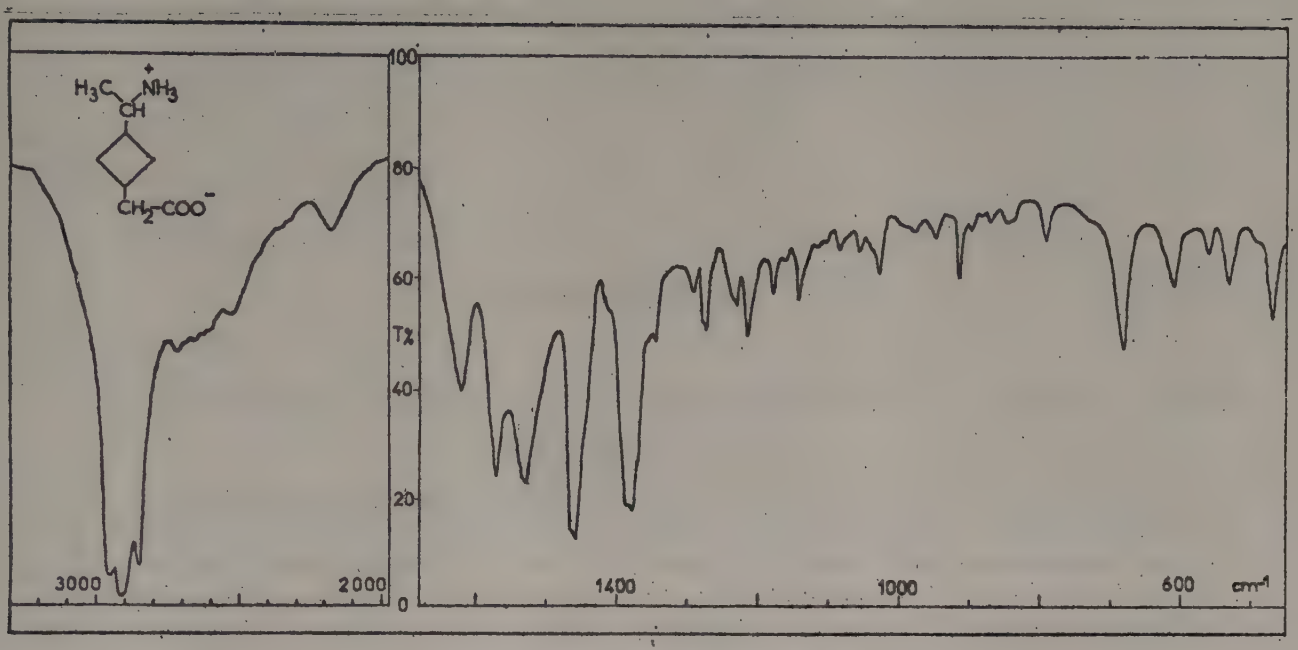
Dans un autoclave de 125 cm^3 on place 2 g d'oxime, 40 ml d'éthanol absolu saturé d'ammoniac par un long barbotage préalable, et 2 g de nickel de Raney. Après fermeture, une pression d'hydrogène de 50 kg/cm^2 est établie dans l'autoclave qui est placé sur un appareil à secousses et chauffé à 80° pendant 6 h. Après refroidissement et retour à la pression normale le nickel est éliminé du mélange réactionnel par filtration sur verre fritté.

- Préparation du chlorhydrate :

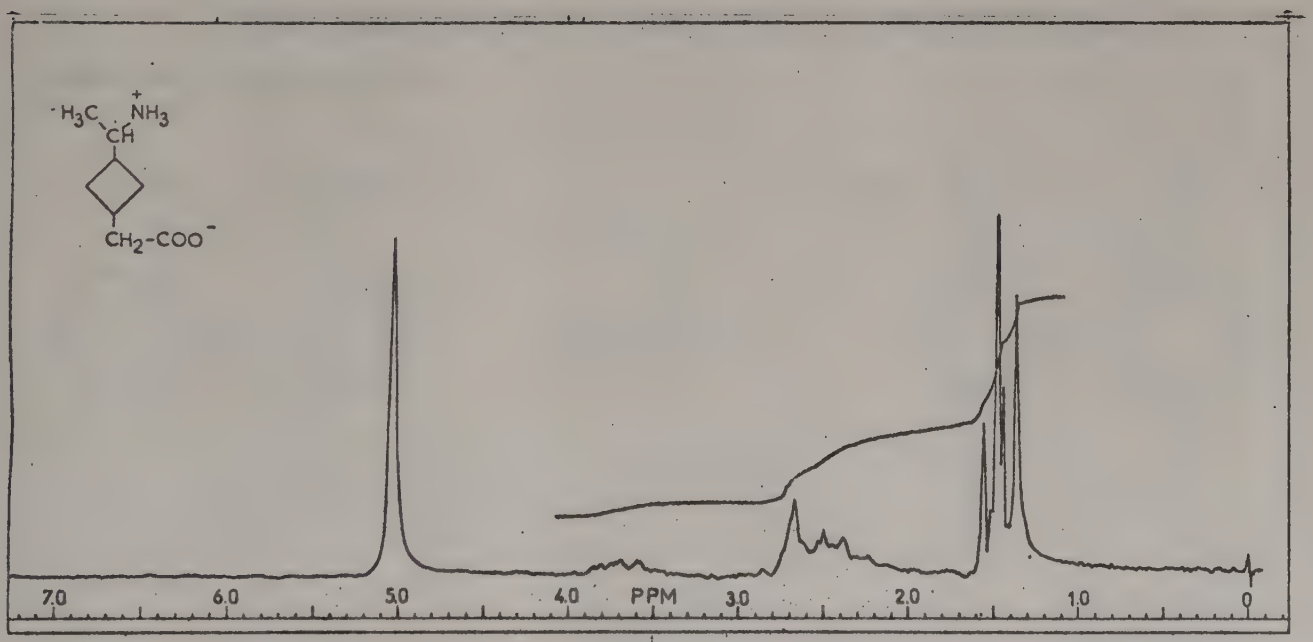
La solution aqueuse est soumise à une évaporation sous pression réduite, le résidu est repris par un minimum d'eau, puis acidifié par HClN versé goutte à goutte, pendant que commence une précipitation de cristaux blancs. Après évaporation on recueille 1, 5 g de cristaux F = 260° (Rdt = 68 %) de chlorhydrate de l'aminoacide.

- Préparation de l'aminoacide libre :

Le résidu résultant de l'évaporation à sec est dissous dans un minimum d'eau tiède, puis abandonné à une lente évaporation, après laquelle on recueille 1 g de cristaux blancs F = 255° (Rdt = 45 %) de l'aminoacide libre.



Spectre Infra-rouge (Nujol)



Spectre RMN (D_2O)

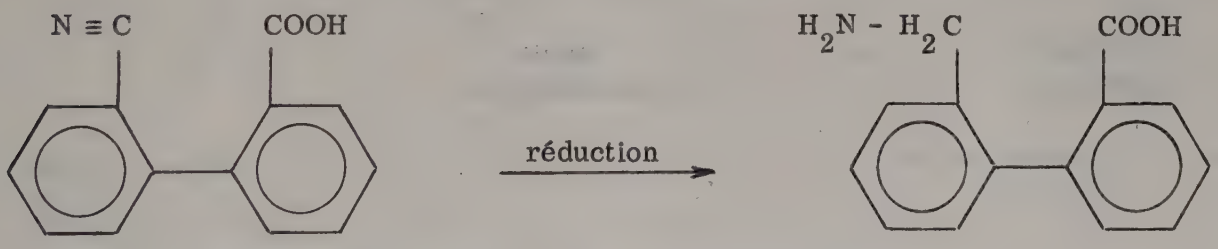
ACIDE dl cis (DIMETHYL-2,2 αAMINOETHYL-3) CYCLOBUTANE ACETIQUE

CHAPITRE VI

SYNTHESE DE L'(HYDROXYCARBONYL-2 AMINOMETHYL-2') DIPHENYLE

Cet acide aminé, à notre connaissance, n'a pas été décrit, ni sous forme libre, ni sous forme de chlorhydrate ou d'autre sel.

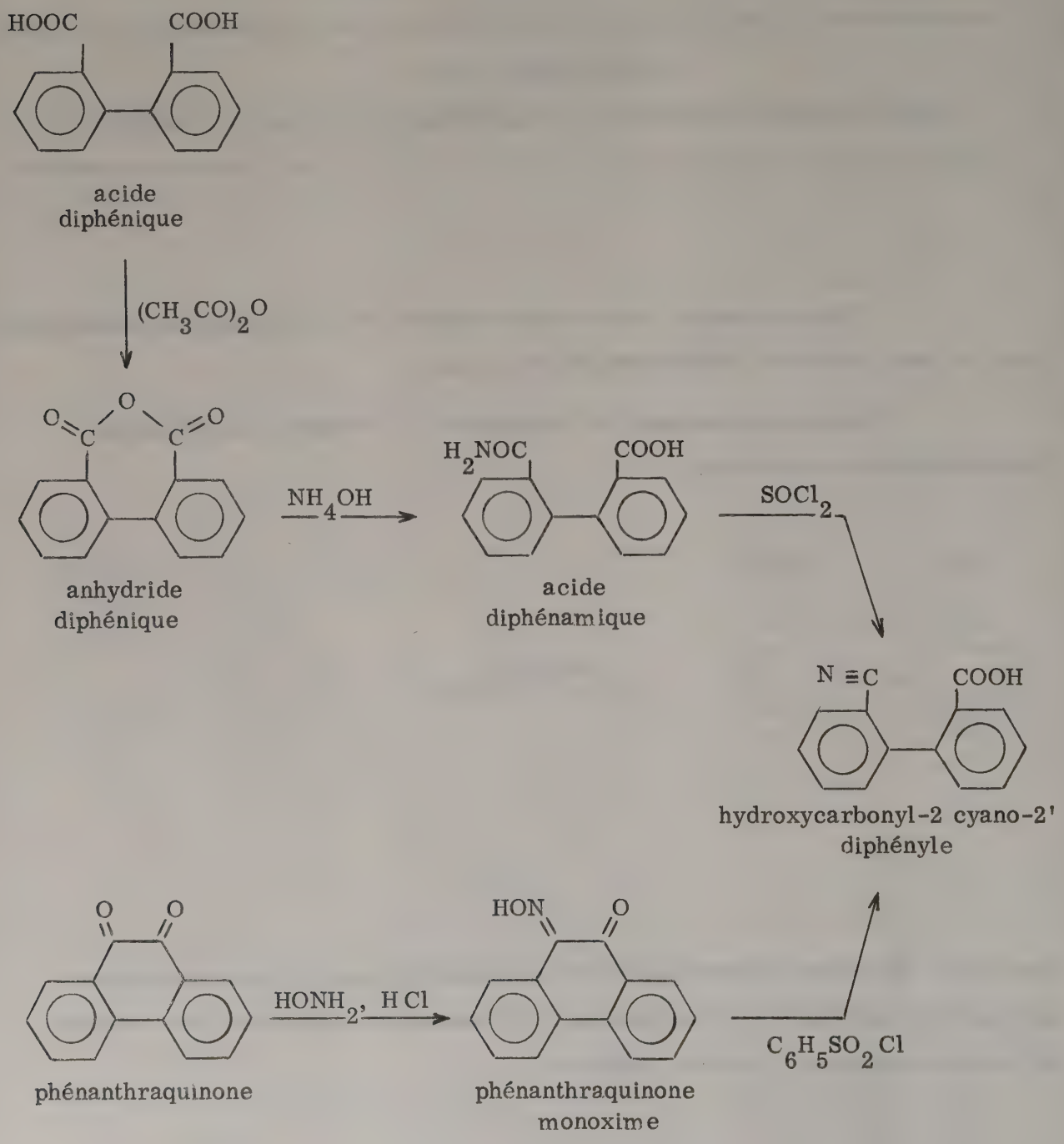
Nous avons envisagé de le préparer par réduction catalytique de l'acide-nitrile correspondant



Remarque : Plusieurs nomenclatures ont été employées pour désigner les dérivés du biphényle (ou diphényle). Sans adopter la Nomenclature Officielle, nous retenons ici celle qui conserve la racine diphényle.

1° - Préparation de l'(hydroxycarbonyl-2 cyano-2') diphényle

Des indications relevées dans la littérature, il résulte que l'(hydroxycarbonyl-2 cyano-2') diphényle peut être préparé à partir de l'acide diphénique ou à partir de la phénanthraquinone. Les deux voies de synthèse possibles reprennent des réactions comparables à celles que nous avions effectuées pour préparer les nitriles des acides camphoriques ; elles peuvent être schématisées de la façon suivante :

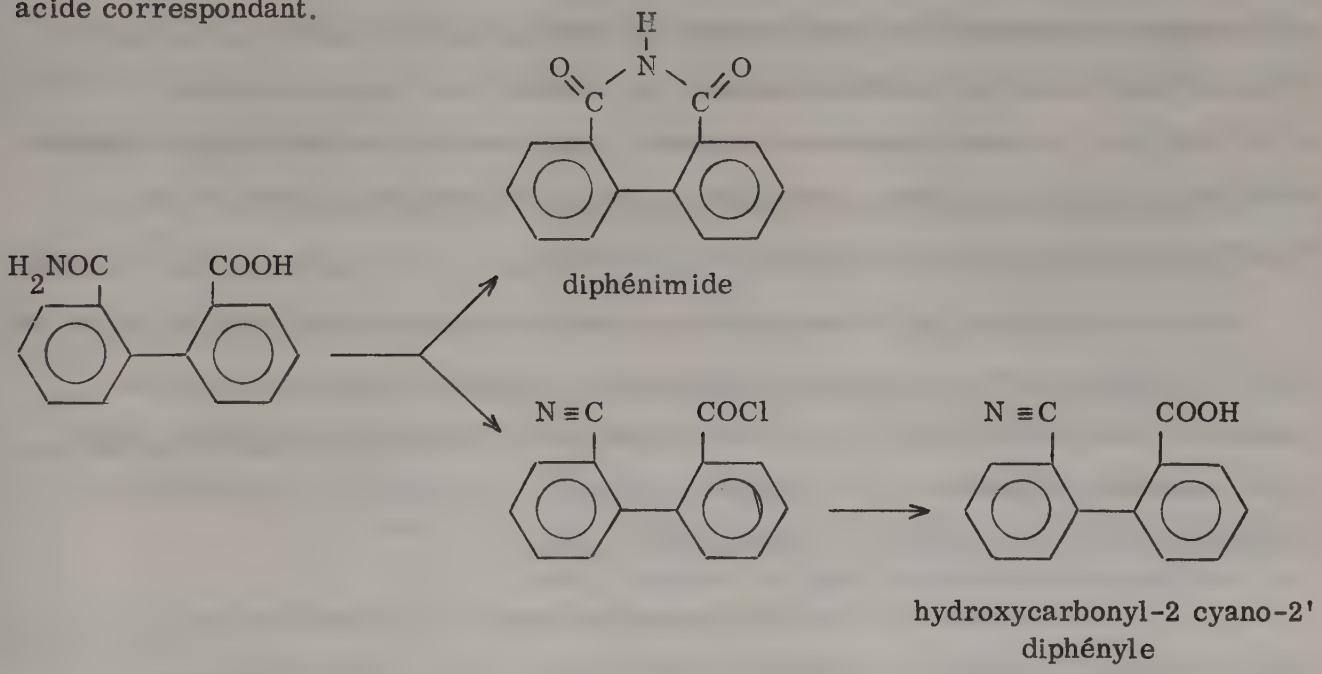


a) Préparation à partir de l'acide diphénique

Depuis longtemps on sait transformer, par action de l'anhydride acétique, l'acide diphénique en anhydride diphénique (200). Par action de l'ammoniaque sur cet anhydride, H.W. UNDERWOOD et col. (201) ont préparé l'acide diphénamique avec un très bon rendement. Puis l'acide diphénamique peut donner lieu à la formation d'(hydroxycarbonyl-2 cyano-2') diphényle :

- par chauffage en présence d'acide et d'anhydride acétique, H.W. UNDERWOOD et col. (202) ont obtenu un faible rendement ; le produit principal de la réaction étant le diphénimide.

- par chauffage en présence de chlorure de thionyle, F. BELL (203) a obtenu avec un rendement satisfaisant le chlorure d'acide de l'(hydroxycarbonyl-2 cyano-2') diphényle ; le chlorure d'acide peut ensuite être facilement transformé en acide correspondant.



b) Préparation à partir de la phénanthraquinone

Par action du chlorhydrate d'hydroxylamine on prépare facilement selon les indication de H. GOLDSCHMIDT (204) puis de R. PSCHORR (205) la monoxime de la phénanthraquinone qui est transformée en (hydroxycarbonyl-2 cyano-2') diphényle par l'action du chlorure de benzène sulfonyle selon la méthode décrite par A. WERNER et col. (206) puis par H. RAPOPORT et col. (207).

c) Réactions effectuées et procédé adopté

Au cours de notre travail nous avons emprunté les deux voies de synthèse possibles pour les raisons suivantes :

- Tout d'abord nous avions retenu la préparation à partir de la phénanthraquinone qui ne comporte que deux étapes ; mais par action du chlorure de benzène sulfonyle sur l'oxime nous n'avons pu reproduire qu'avec un rendement de 10 à 20 % la préparation de l'(hydroxycarbonyl-2 cyano-2') diphényle réalisé par H. RAPOPORT et col. (207) avec un rendement de 88 %.

- Sans chercher à expliquer cet abaissement du rendement nous avons entrepris la synthèse à partir de l'acide diphénique. Cette voie qui comporte une étape de plus que la précédente, fut encore ralentie par le fait que l'acide diphénique qui nous fut livré par le commerce n'était pas suffisamment pur pour conduire à l'anhydride diphénique sans produit secondaire ; il nous fallut le décolorer et le recristalliser.

- A cause de cet inconvénient nous sommes revenus à la transformation de la phénanthraquinone monoxime, mais en remplaçant le chlorure de benzène sulfonyle par le chlorure de thionyle, en nous référant aux travaux de F. SALMON-LEGAGNEUR (171) qui, dans le cas de l'isonitrosocamphre qui possède le même groupement -CO-CNOH- que la phénanthraquinone monoxime, avait employé ce réactif pour former le dérivé acide-nitrile. A notre connaissance, l'action du chlorure de thionyle sur la phénanthraquinone monoxime n'avait pas été envisagée.

Ce changement de réactif nous a permis d'obtenir l'(hydroxycarbonyl-2 cyano-2') diphényle avec un rendement satisfaisant. Nous avons pu constater que la réaction du chlorure de thionyle sur l'oxime a lieu dès la température ambiante, mais que le rendement augmente si l'on chauffe les réactifs : 33 % pour 1 h. à température ordinaire, 50 % pour 30 mn à 60 ° et 60 % pour 2 h. à 60 °.

Ce procédé nous a semblé le plus approprié à la préparation de l'(hydroxycarbonyl-2 cyano-2') diphényle, dont le P.F. = 170 - 172° est identique à celui observé par H. RAPOPORT et col. (207). Son spectre infra-rouge présente à 2230 cm^{-1} la fine bande caractéristique de la vibration de valence $\nu_{C \equiv N}$ et à 1700 cm^{-1} la bande intense caractéristique de la vibration de valence $\nu_{C = 0}$ de la fonction carboxylique.

2° - Préparation de l'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle

Pour réduire la fonction nitrile en groupement aminométhyle nous avons retenu les conditions de réduction catalytique que nous avions déjà adoptées pour préparer, à partir des nitriles correspondants, les acides aminocampholiques : nickel de

RANEY comme catalyseur et conditions modérées de pression et de température en milieu ammoniacal (173). Comme ce fut le cas pour les acides aminocampholiques, nous avons obtenu, selon la conduite de l'extraction adoptée, le chlorhydrate ou d'hydrate de l'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle.

a) Chlorhydrate de l'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle

Après filtration, puis évaporation à sec de la solution ammoniacale soumise à la réduction, le résidu est repris par quelques ml d'une solution d'acide chlorhydrique au demi. Une petite fraction du nitrile de départ non réduit, demeure insoluble et est isolée par filtration. Après évaporation on recueille de fins cristaux blancs F = 220° (décomp.).

La caractérisation de ces cristaux repose sur les données suivantes :

- Le spectre infra-rouge confirme qu'il n'y a plus de nitrile non réduit (absence de la bande à 2230 cm^{-1}) ; il présente à 1710 cm^{-1} la bande caractéristique de la vibration de valence $\nu_{C=0}$ de la fonction carboxylique.

Vers 1600 cm^{-1} nous notons la présence de petites bandes que l'on peut attribuer aux noyaux aromatiques de la molécule. Cette région semble dépourvue des bandes caractéristiques des vibrations de déformation $\delta_{NH_3^+}$ que nous attendions.

Nous notons aussi, sans donner d'interprétation, la présence de deux petites bandes vers 3500 cm^{-1}.

- Le spectre R.M.N. du produit en solution dans l'eau lourde présente :

. à 4,16 ppm un singulet qui peut être attribué aux protons d'un groupement CH_2N^+.

. vers 7,68 ppm un massif aux nombreux pics qui peut correspondre à divers protons aromatiques.

L'intégration de ces signaux montre que, dans la molécule, à deux protons CH_2N^+ correspondent 8 protons aromatiques.

- Le spectre de masse présente :

. un pic à la masse 227 qui est la masse moléculaire du composé

$$HOOC-C_6H_4-C_6H_4-CH_2NH_2$$

. un pic à la masse 209 qui peut correspondre à la molécule précédente après perte d'une molécule d'eau.

. un pic à la masse 197 qui peut être attribué à la molécule

précédente après perte du groupement $-CH_2-NH_2$.

. un pic à la masse 182 qui peut correspondre à la molécule de masse 227 après perte du groupement-COOH.

. un pic à la masse 181 qui peut correspondre à l'ion de masse 209 après départ du groupement carbonyle.

. des pics aux masses 166, 152, 106, qui pourraient être respectivement attribués aux structures $\underline{C_6H_4 - C_6H_4 - CH_2}$, $-C_6H_4 - C_6H_4 -$, $-C_6H_4 - CH_2NH_2$.

. enfin des pics très intenses aux masses 30 et 18 qui correspondent respectivement au groupement $-CH_2NH_2$ et à la molécule H_2O.

- L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

	C	H	N	O	Cl
% calculés pour $HOOC-C_6H_4-C_6H_4-CH_2NH_2, HCl$	63,70	5,32	5,32	12,16	13,50
% trouvés	62,56	5,42	5,16	12,72	13,22

De cet ensemble de résultats nous retenons :

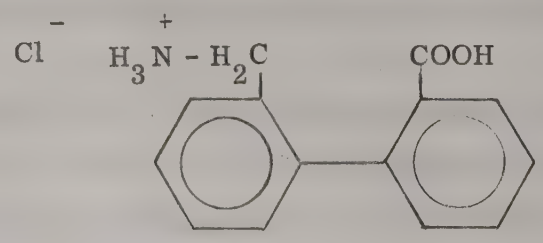
- que le spectre infra-rouge ne présente pas ou présente d'une façon très atténuée les bandes habituellement caractéristiques des vibrations de déformation du groupement NH_3^+.

- mais que le spectre R.M.N. est en accord avec l'existence du groupement CH_2N^+ et que le spectre de masse et l'analyse élémentaire sont en accord avec un composé de structure

$$HOOC - C_6H_4 - C_6H_4 - CH_2NH_2, H Cl$$

Bien que nous ne puissions pour l'instant expliquer complètement l'allure du spectre infra-rouge, les résultats de l'étude R.M.N. et de masse, ainsi que l'analyse élémentaire, nous autorisent, compte tenu de la réaction chimique qui a été mise en œuvre, à identifier le composé préparé au chlorhydrate de l'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle.

Ce composé, à notre connaissance, n'avait pas été décrit.



b) Hydrate de l'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle

Lorsque le résidu de l'évaporation à sec de la solution ammoniacale est repris dans un minimum d'eau chaude, filtré, puis abandonné pendant quelques mn, lors du retour à température ordinaire, il se forme de fines aiguilles incolores F = 198° (décomp.).

La détermination de leur structure repose sur

- Le spectre infra-rouge :

. les deux bandes à 1400 cm^{-1} et à 1540 cm^{-1} caractérisent les vibrations de valence du groupement COO^- ; la bande à 1540 cm^{-1}, large, comporte vrai semblablement une des bandes attribuables à la vibration de déformation du groupement NH_3^+, l'autre apparaissant à 1610 cm^{-1}.

. le massif de 3300 à 3600 cm^{-1} est dû à la présence d'eau ; la bande à 1640 cm^{-1} suggère l'eau de cristallisation.

- Le spectre R.M.N.

. un singulet à 3,95 ppm peut correspondre aux protons d'un groupement CH_2N^+.

. un multiplet vers 7,40 ppm que l'on peut attribuer aux protons aromatiques.

L'intégration de ces pics montre que dans la molécule, aux 2 protons CH_2N^+ correspondent 8 protons aromatiques.

L'intégration du pic de l'eau formée à partir de l'échange des 3 protons des fonctions acide et amine, comparée à celle de l'eau déjà présente dans l'eau lourde, fait apparaître que l'échange a concerné pratiquement 6 protons, c'est-à-dire 3 de plus que ceux des fonctions acide et amine. Ce résultat est en accord avec la forme hydrate ($^3/_2\ H_2O$) du composé attendu.

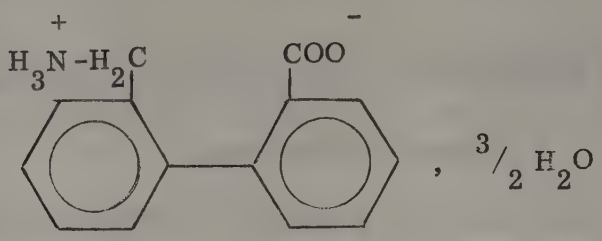
- L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

	C	H	N	O
% calculés pour $H_2N\text{-}CH_2\text{-}C_6H_4\text{-}C_6H_4\text{-}COOH,\ ^3/_2\ H_2O$	66,14	6,29	5,51	22,05
% trouvés	66,36	6,14	5,50	22,00

- L'analyse thermogravimétrique montre que lorsqu'un échantillon est soumis à une lente élévation de température (50° par h), il subit une perte de poids commençant vers 30° et s'arrêtant vers 80° qui correspond à 1,46 mole d'eau pour une

mole de produit anhydre $C_{14}H_{13}NO_2$.

Ces différents résultats permettent d'attribuer au composé préparé la structure de l'hydrate de l'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle.



, $^3/_2\ H_2O$

A notre connaissance, ce composé n'avait pas été décrit, ni sous forme libre, ni sous forme hydratée.

Signalons toutefois un récent brevet (208), qui décrit le composé dérivant de cet acide aminé par substitution d'un des H de la fonction amine par un groupement méthyle.

Chapitre VI - PARTIE EXPERIMENTALE

1° - Préparation de la phénanthraquinone monoxime

7 g de chlorhydrate d'hydroxylamine sont ajoutés à une solution de 20,8 g de phénanthraquinone dans 100 ml d'éthanol. La solution est chauffée au reflux pendant 1 h. Lors du refroidissement il se forme 18 g de fines aiguilles jaunes de phénanthraquinone monoxime.

2° - Préparation de l'(hydroxycarbonyl-2 cyano-2') diphényle

4 ml de chlorure de thionyle fraîchement distillé sur huile de lin sont ajoutés à 4 g de phénanthraquinone monoxime. La réaction est vive, lorsqu'elle se ralentit, le mélange est chauffé à 60° pendant 2h. Après refroidissement, 20 ml d'une solution 2N de carbonate de sodium est ajoutée et le tout est porté au reflux pendant 1/2 h environ. Après refroidissement la solution est filtrée, le résidu insoluble est à nouveau traité par 20 ml d'une solution de carbonate de sodium. Les deux filtrats sont réunis puis neutralisés exactement par une solution d'acide chlorhydrique au demi. Il se forme un précipité qui est lavé à l'eau, séché, puis recristallisé dans le benzène. On recueille 2,4 g de fins cristaux blancs F = 170 - 172° d'(hydroxy-carbonyl-2 cyano-2') diphényle (Rdt = 60 %).

3° - Préparation de l'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle

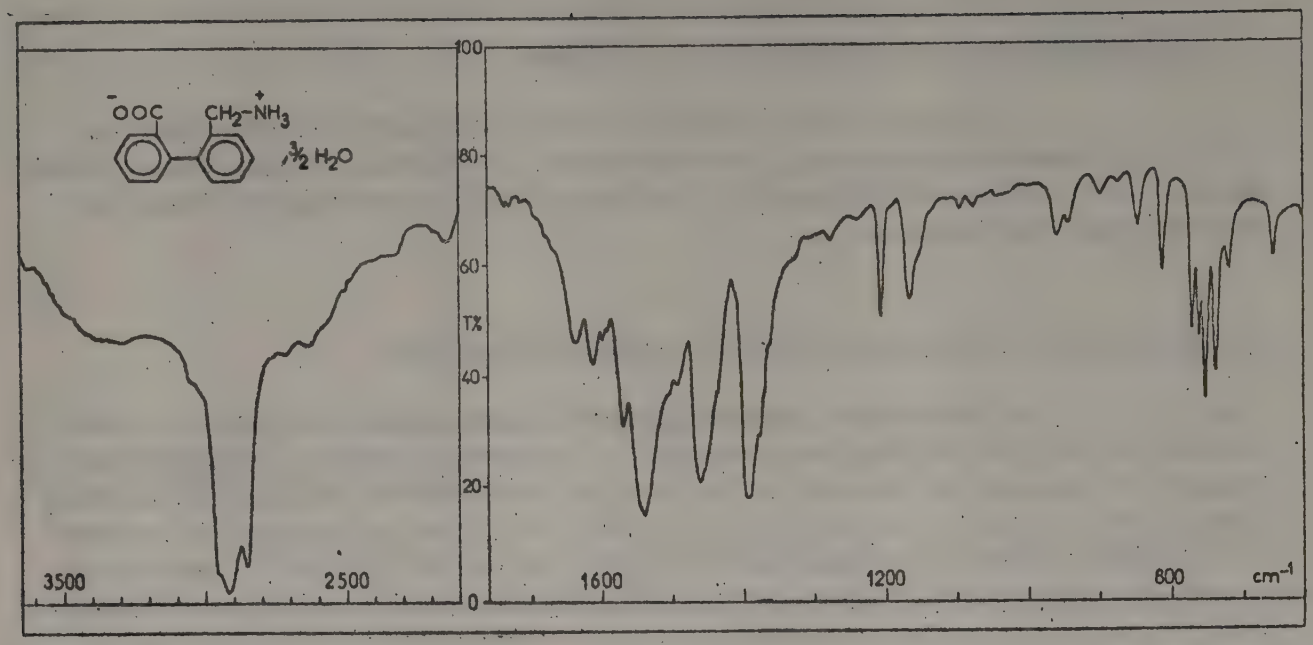
Dans un autoclave de 125 cm^3 on introduit 2 g d'(hydroxycarbonyl-2 cyano-2') diphényle, 20 ml d'eau, 10 ml d'ammoniaque concentrée (d = 0,92) et 2 g de nickel de Raney. Après fermeture, une pression d'hydrogène de 50 kg/cm^2 est établie dans l'autoclave qui est placé sur un appareil à secousses, à température ambiante pendant 6 h.

a) Préparation du chlorhydrate :

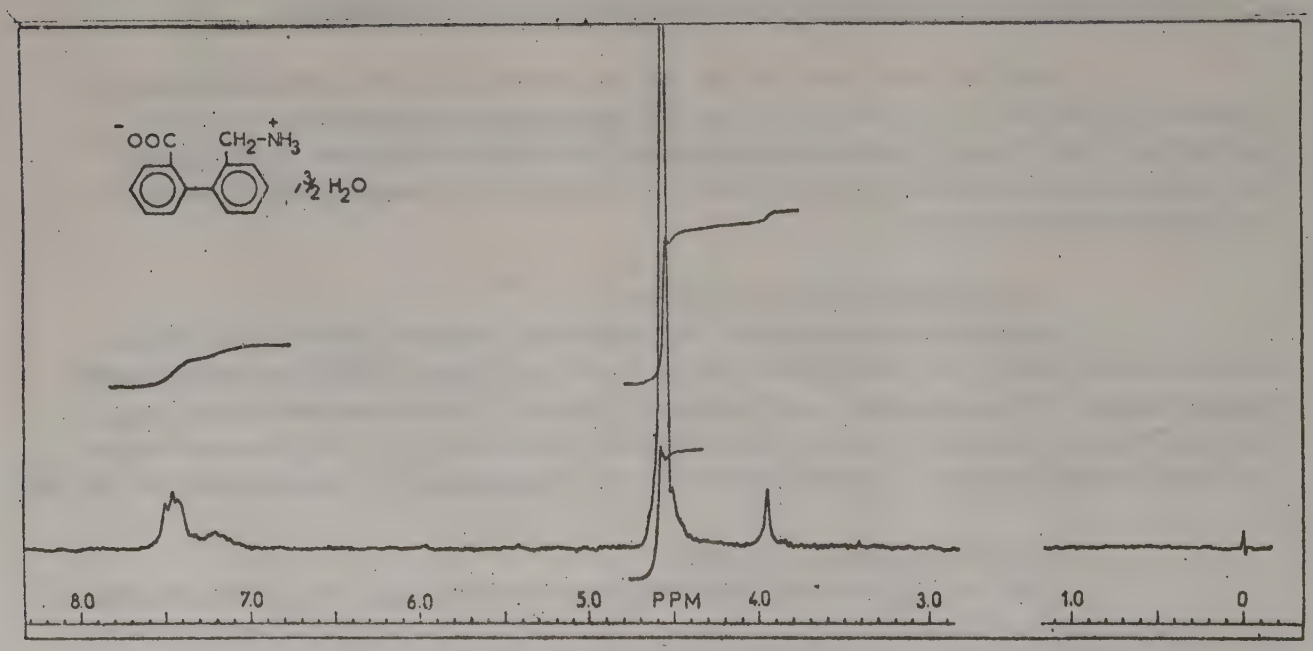
La solution aqueuse est évaporée sous pression réduite ; le résidu débarassé de l'ammoniac est repris par un peu d'eau, puis acidifié par une solution d'acide chlorhydrique au demi versée goutte à goutte. Le résidu insoluble (0,2 g) est éliminé par filtration. Après évaporation on recueille 1,5 g de cristaux blancs F = 220° de chlorhydrate d'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle (Rdt = 60 %).

b) Préparation de l'hydrate :

L'eau de la solution réactionnelle est évaporée à sec, le résidu blanc est dissous dans un minimum d'eau chaude. Dès le retour à température ordinaire il précipite 1,7 g de fines aiguilles incolores F = 198° (décomp.) d'hydrate d'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle (Rdt = 65 %).



Spectre Infra-rouge (Nujol)



Spectre RMN (D_2O)

(HYDROXYCARBONYL-2 AMINOMETHYL-2') DIPHENYLE HYDRATE.

TROISIEME PARTIE

RECHERCHE ET DETERMINATION DU POUVOIR ANTIFIBRINOLYTIQUE DES COMPOSES SYNTHETIQUES

RESULTATS ET DISCUSSIONS.

Après avoir obtenu les composés dont nous venons de décrire les méthodes de synthèse, nous recherchons s'ils sont doués de propriétés antifibrinolytiques que, dans l'affirmative, nous déterminerons.

Notre étude comporte les étapes suivantes :

- Etude critique des méthodes d'évaluation du pouvoir antifibrinolytique
- Description des méthodes adoptées
- Résultats expérimentaux et discussions.

CHAPITRE I

ETUDE CRITIQUE DES METHODES D'EVALUATION DU POUVOIR ANTIFIBRINOLYTIQUE

L'évaluation de l'efficacité des inhibiteurs de la fibrinolyse présente plusieurs aspects :

- Evaluation in vitro ou in vivo.
- Evaluation d'inhibiteurs sériques ou d'inhibiteurs introduits dans le sang ou dans l'organisme.

Dans le cadre de notre travail nous nous limitons à l'évaluation in vitro de l'efficacité des inhibiteurs synthétiques.

Dans ce domaine, de nombreux résultats ont été publiés mais ils diffèrent parfois fortement, vraisemblablement par suite de la multiplicité des techniques employées. En vue de choisir la plus convenable à notre avis, nous avons procédé à une étude critique des méthodes proposées ; elles répondent toutes au même principe : observer la lyse d'un substrat solide en présence d'inhibiteurs.

Pour évaluer la lyse, on peut passer par l'intermédiaire de diverses grandeurs mesurables.

Pour chaque méthode, les dispositions techniques à adopter et

l'incertitude qui caractérise le résultat sont liées à la nature du paramètre choisi. Nous classerons donc les différentes méthodes décrites en fonction de la mesure qu'elles comportent :

- Temps de lyse
- Surface de lyse
- Radioactivité
- Fluorescence
- Thromboélasticité.

I - METHODES BASEES SUR LA MESURE D'UN TEMPS DE LYSE

Dans une étude des principales méthodes de dosage des inhibiteurs sériques de la fibrinolyse, J. DAVER et col. (63) ont distingué deux types, selon que le principe fait appel ou non à l'addition d'un activateur. Nous conserverons cette distinction

A. METHODES SANS ADDITION D'ACTIVATEUR

1° - Etude du temps de lyse d'un substrat physiologique inchangé

Ce substrat peut être un caillot de sang total ou un caillot plasmatique.

a) Caillot de sang total

Il coagule spontanément et est maintenu à 37° en milieu physiologique. La mesure consiste à observer le temps demandé par la lyse complète et à le comparer à la durée normale (72 h environ).

b) Caillot plasmatique

Il est obtenu après recalcification d'un plasma oxalaté, son temps de lyse, à 37°, est comparé à la durée normale (24 à 48 h) (210).

Ces deux techniques sont peu pratiques par suite de la durée à évaluer, qui serait encore augmentée en présence d'inhibiteurs.

2° - Etude du temps de lyse d'un substrat physiologique transformé

a) Transformation par dilution

Elle a pour but de diminuer l'action des inhibiteurs sériques et, de ce fait, rendre décelable une faible variation du rôle joué par les activateurs du système plasminogène - plasmine.

Trois techniques basées sur ce principe ont été successivement proposées par R. MAC FARLANE et col. (67), J. DAUSSET et col. (211) et G.R. FEARNLEY et col. (212). Cette dernière a été très employée pour étudier les variations physiologiques de la fibrinolyse, surtout dans le sens de l'augmentation du rôle des activateurs.

b) Transformation par précipitation des euglobulines

Elle a pour but d'éliminer les inhibiteurs sériques du substrat précipité. La précipitation des euglobulines est obtenue par acidification, soit par passage d'un courant de gaz carbonique (213, 214), soit par addition d'acide acétique (66, 215). On isole ainsi un caillot d'euglobulines qui renferme

- le substrat protéique qui pourra être lysé
- le système plasminogène - activateurs qui donnera la plasmine permettant la lyse des protéines.

L'étude du temps de lyse du caillot d'euglobulines fournira donc des renseignements sur l'activité fibrinolytique du plasma à partir duquel il a été obtenu. Par contre on ne pourra rien déduire du pouvoir inhibiteur de ce plasma puisque les inhibiteurs sériques sont restés en solution (ou alors il faudra utiliser le surnageant (216), et réaliser l'expérience avec un caillot d'une autre provenance).

De nombreux dosages d'inhibiteurs de synthèse ont aussi été effectués par mesure du temps de lyse d'un caillot d'euglobulines placé dans une solution contenant l'inhibiteur. On peut toutefois reprocher (215, 217) à cette méthode de ne donner qu'un mauvais reflet de l'activité fibrinolytique in vivo, puisque l'expérience est faite en l'absence des inhibiteurs naturels restés dans le surnageant, ce qui explique vraisemblablement le désaccord de certains résultats avec ceux obtenus par d'autres méthodes (211, 215).

En résumé, les méthodes ne faisant pas appel à l'addition d'activateurs, ne nous semblent pas adaptées à l'évaluation de l'efficacité des inhibiteurs synthétiques de la fibrinolyse, car elles conduisent à la mesure d'un temps très long, ce qui présente comme inconvénients :

- d'être mal commode si la surveillance de la lyse doit être faite par l'expérimentateur, ou techniquement compliqué si la surveillance doit être assurée par un des dispositifs ingénieux décrits par certains auteurs (218, 219, 220).
- de conduire à des résultats entachés d'une très grande incertitude, car il s'agit de méthodes comparatives affectées par la très mauvaise reproductibilité d'un phénomène extrêmement lent.

B. METHODES AVEC ADDITION D'ACTIVATEURS

L'addition d'activateurs de la fibrinolyse a pour but de diminuer les temps de lyse habituels. Les nombreuses méthodes qui y font appel constituent le groupe des méthodes par "CAILLOT STANDARD".

Elles ont été très largement employées par de nombreux auteurs qui ont proposé diverses variations techniques, mais toutes reposent sur un principe commun : la mesure du temps de lyse, en présence d'activateurs, d'un substrat coagulé maintenu à température constante. La base théorique de ce principe est la suivante :

- le temps de lyse du substrat protéique est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme protéolytique présente dans le milieu (221).

- dans un tel milieu, si on fixe le taux d'activateurs par addition d'une quantité définie (suffisamment grande pour que l'action des activateurs du sérum soit négligeable), la quantité d'enzyme protéolytique ne dépendra que du taux d'inhibiteurs et variera de façon inverse.

- le temps de lyse sera alors directement lié au taux d'inhibiteurs.

Divers résultats ont confirmé la validité de cette théorie (222, 223, 224).

1° - Variations méthodologiques

Les différences qui distinguent les méthodes peuvent porter sur

- le substrat
- l'activateur
- les conditions de la lyse.

a) Le substrat

La fibrine est le substrat le plus employé, en effet c'est lui que, par définition, on doit soumettre à la lyse ; c'est aussi le plus naturel et le plus sensible à l'activité lytique. Mais la fibrine n'est pas obtenue à l'état absolument pur à partir du fibrinogène, elle renferme des quantités plus ou moins importantes de plasminogène ; c'est pourquoi d'autres substrats ont été employés.

- des protéines, telles que la caséine (83, 225, 226)

- des esters, tels que des esters d'aminoacides : ester méthylique de la tosyl arginine (TAME) et ester méthylique de la benzoyl arginine (BAME) (145, 227, 228).

b) L'activateur

- La streptokinase est la plus employée (228, 229).
- L'urokinase est souvent utilisée (230, 231).
- La trypsine est rarement utilisée (64).

c) Les conditions de la lyse

- Le temps de lyse du caillot activé dépend des quantités de substrat et d'activateur employées. Chaque auteur les a choisies en vue de la détermination d'un temps très réduit par rapport à celui de la lyse du caillot non activé : 20 à 60 mn (213, 214, 233), 10 mn (229, 230, 231), 2 à 3 mn (83, 226).

- Le moment à partir duquel on mesure les temps varie selon les auteurs : l'addition de l'agent coagulant (230) ou l'addition de l'activateur (229) définissent le plus souvent le temps zéro.

- Le moment qui définit la fin de la lyse est également variable : lorsque le tube est clair (76), lorsque des bulles apparaissent à la surface du caillot (214), lorsque tombe au fond du tube une bille métallique déposée sur le caillot au début de l'expérience (234).

- La température adoptée pour effectuer la lyse est 37° (229, 231, 235), 28° (228) ou 45° (83, 226).

2° - Technique de HAWKEY

La technique de HAWKEY (229) a été très largement employée pour doser les inhibiteurs sériques de la fibrinolyse.

- Le substrat est constitué par du sérum additionné d'une solution d'euglobulines et d'une solution de fibrinogène. L'agent coagulant est la thrombine.

- L'activateur est la streptokinase, la plasmine ou l'urokinase ; la concentration est ajustée en sorte qu'un sérum normal témoin donne un temps de lyse de 10 mn.

- Le temps zéro est déterminé par l'addition de l'activateur. Le milieu est maintenu à 37° et le temps de lyse est mesuré lorsque le caillot est complètement dissous.

Après une étude comparative très complète, J. DAVER et col. (236) considèrent cette technique comme représentative des méthodes par "caillot standard". Ils ont en outre constaté que l'origine du fibrinogène (bovin ou humain), la nature de l'activateur (streptokinase ou urokinase) et la présence ou l'absence d'euglobines sont sans influence sur les résultats.

C. CONCLUSION

Les méthodes basées sur la mesure d'un temps de lyse, élaborées pour des dosages d'inhibiteurs sériques, ont été souvent utilisées pour évaluer l'efficacité des inhibiteurs de synthèse (109 à 113, 119, 120, 122, 123, 125, 126, 137, 138, 140, 141). Mais si l'emploi d'activateurs qui diminuent le temps de lyse, simplifie beaucoup la technique, la détermination du moment qui correspond à la fin de la lyse semble demeurer un problème délicat et entraîne l'incertitude qui entache les résultats.

II - METHODES BASEES SUR LA MESURE D'UNE SURFACE DE LYSE

Le principe de ces méthodes repose sur une constatation de T. ASTRUP et col. (237), selon laquelle il existe une relation directe entre la quantité d'activateurs et la surface de lyse qu'ils provoquent sur un film de fibrine ou d'un autre substrat.

Les méthodes consistent donc à réaliser un film de fibrine (21, 64, 76, 232, 237, 238) de caséine (239) ou de gélatine (240) et à y déposer une petite quantité de la substance dont on veut connaître l'activité fibrinolytique ; après un temps déterminé, on mesure la surface de lyse par le produit de deux diamètres perpendiculaires puis on la compare à celle produite par une substance de référence.

Ces méthodes, dites des "PLATEAUX DE FIBRINE" peuvent être employées pour le dosage des activateurs ou des inhibiteurs de la fibrinolyse ; elles ont surtout été retenues pour étudier les variations de l'activité fibrinolytique dans le sérum humain (63, 241).

Après une étude comparative, J. DAVER et col. (241) ont retenu comme représentative des méthodes de ce groupe, la technique de S. BLIX (217) qui consiste à incorporer le sérum à étudier au fibrinogène à partir duquel on réalise le film de fibrine ; une diminution de la surface de lyse correspond évidemment à une augmentation du pouvoir inhibiteur. Pour diminuer l'erreur de calcul des surfaces ils proposent deux modifications concernant

- la façon de déposer l'activateur afin d'obtenir des surfaces de lyse plus circulaires
- la mesure de la surface par projection sur un papier millimétré.

Des méthodes de ce type ont été employées pour doser des inhibiteurs de synthèse en incorporant une solution du produit à étudier au fibrinogène à partir duquel sera formé le film de fibrine (107, 115, 116). La méthode de BLIX, avec ses derniers perfectionnements, semble pouvoir être retenue pour ces dosages.

III - METHODES BASEES SUR LA MESURE D'UNE RADIOACTIVITE

Malgré certains perfectionnements, les méthodes faisant appel à la mesure d'un temps de lyse ou à la mesure d'une surface de lyse présentent certains inconvénients entraînant un manque de précision, de plus elles ne permettent pas de suivre directement la lyse dans le temps.

En 1950, N. R. SHULMAN et col. (242) proposèrent, pour déterminer l'activité protéolytique de certaines enzymes, de suivre par augmentation de la radioactivité du surnageant, la lyse d'un caillot formé à partir de fibrinogène marqué.

Par la suite, de nombreuses études de la fibrinolyse firent appel à la radioactivité (29, 78, 242, 243, 244, 245). Ces méthodes reposent sur le principe suivant :

- un caillot radioactif est formé par coagulation de fibrinogène marqué (29, 245) ou d'un plasma enrichi en fibrinogène marqué (78, 243, 244).
- le caillot est immergé dans un milieu synthétique (244, 245) ou dans du plasma (29).
- l'évolution de la lyse est suivie par la mesure de la radioactivité qui apparaît dans le milieu où le caillot est immergé ; elle est d'autant plus faible que le milieu a un important pouvoir antifibrinolytique.

Il s'ensuit que ces méthodes peuvent être indifféremment appliquées au dosage des inhibiteurs sériques ou synthétiques. En ce qui concerne ces derniers, différentes modalités opératoires ont été proposées.

Les premiers travaux ont permis de constater que la reproductibilité des résultats est liée au marquage du caillot par l'iode radioactif : le marquage doit concerner uniquement la fibrine, à l'exclusion d'autres protéines, qui pourraient libérer l'iode radioactif indépendemment du phénomène de fibrinolyse. On retrouvera donc dans chaque technique la recherche du marquage exclusif de la fibrine qui peut être atteint en assurant

- la meilleure qualité possible du fibrinogène radioactif
- la coagulation la plus complète possible
- le lavage du caillot formé, destiné à éliminer toute radioactivité externe au caillot lui-même.

1° - Technique de DUDOK DE WIT (244)

Les caillots sont préparés à partir d'un plasma enrichi en plasminogène et en fibrinogène marqué à l'iode I^{131}. Dans le plasma plonge l'extrémité inférieure d'une tige de verre. En se formant, le caillot adhère à la tige et l'on obtient ainsi un caillot monté, en quelque sorte ; cela facilite les manipulations ultérieures et en particulier le lavage du caillot. L'intérêt réside dans le fait qu'il est ainsi possible d'atteindre une standardisation des manipulations du caillot, nécessaire pour obtenir une bonne reproductibilité des mesures.

2° - Technique de DEUTSH et FISHER (246)

Cette technique a été mise au point pour effectuer une étude comparative du pouvoir antifibrinolytique de différents composés. Les caillots sont préparés suivant le procédé DUDOK DE WIT, puis ils sont placés pendant 1 h dans une solution contenant à la fois un activateur de la lyse et le composé inhibiteur à étudier.

Les mesures des pourcentages de lyse du caillot sont effectuées sur deux séries de solutions dans lesquelles des caillots identiques ont été placés :

- la première série est constituée d'une quantité constante d'inhibiteur et d'une quantité variable d'activateur (streptokinase)

- la deuxième série est constituée d'une quantité constante d'activateur et d'une quantité variable d'inhibiteur.

3° - Technique de BAUMGARTEN (132)

Cette technique a pour objet l'évaluation du pouvoir antifibrinolytique d'inhibiteurs synthétiques.

Les caillots sont préparés à partir de plasma enrichi en fibrinogène marqué à l'iode I^{125}. A la différence des deux techniques précédentes il n'y a pas ici d'addition de plasminogène. Les caillots sont encore formés autour de la partie inférieure de tiges de verre puis "lavés" par immersion dans une solution tampon. Ils sont mis ensuite dans une solution contenant un activateur de la lyse et l'inhibiteur à étudier.

L'activateur n'est pas ici enzymatique mais chimique : c'est l'acide thymotique ou acide méthyl - 6 isopropyl - 3 salicylique. Toutefois le "lavage" des

caillots leur fait perdre leur sensibilité à l'action de l'acide. Pour la restituer, W. BAUMGARTEN et col. (132) ajoutent, et disent être fondés pour le faire, des protéines sériques dans le milieu d'immersion.

La mesure est encore celle de la radioactivité du surnageant après un temps déterminé d'incubation.

4° - Conclusion

D'une façon générale ces techniques exigent l'emploi de fibrinogène marqué et l'usage d'un appareil de comptage de rayonnement radioactif, mais elles présentent certains avantages qui l'emportent sur les inconvénients :

- elles éliminent la difficulté d'appréciation de la fin de la lyse
- elles permettent de déceler et d'évaluer de faibles pouvoirs inhibiteurs
- elles permettent de suivre dans le temps la lyse d'un caillot.

En définitive elles semblent bien adaptées au but poursuivi.

IV - METHODES BASEES SUR UNE MESURE DE FLUORESCENCE

Le manque de sensibilité des méthodes par mesure d'un temps ou d'une surface de lyse d'une part, et la nécessité de posséder un équipement très particulier adapté aux mesures radioactives, d'autre part, ont amené en 1961 E.F. LÜSCHER et col. (247) à mettre au point une méthode dans laquelle la lyse d'un caillot de fibrine peut être suivie par une mesure de fluorescence.

Une solution de fibrinogène fluorescent (248, 249, 250), dont la coagulabilité est pratiquement inchangée, est ajoutée au substrat dont on veut étudier la lyse. Après coagulation par de la thrombine, puis incubation à 37°, les caillots sont égouttés et la solution est soumise au rayonnement d'une lampe à vapeur de mercure ; la fluorescence est immédiatement mesurée à 560-570 nm.

Cette méthode paraît spécifique et sensible ; d'après ses auteurs elle est simple et rapide. La littérature cependant s'y réfère peu. A notre avis, ses qualités certaines sont minimisées par la nécessité de préparer du fibrinogène fluorescent ce qui, vraisemblablement, explique son faible succès.

V - METHODES THROMBOELASTOGRAPHIQUES

Pour essayer de suivre le phénomène de la lyse d'un caillot de fibrine, différents auteurs ont eu recours à une méthode thromboélastographique. K. EGEBLAD (251) fit en 1967 une mise au point très complète des tentatives dans ce sens et de ses propres observations. Il en ressort que de nombreux facteurs influencent l'amplitude du T.E.G., entre autres :

- l'origine du fibrinogène (bovine ou humaine), sa concentration
- le rapport des concentrations de thrombine et de fibrinogène
- la force ionique et le pH
- la plasmine si elle est présente au moment de la formation du caillot et les produits de la décomposition du fibrinogène qu'elle entraîne
- la quantité des thrombocytes présents
- le citrate de sodium.

Le choix du caillot standard doit donc se faire en fonction de nombreux paramètres ; différentes possibilités ont été envisagées

- emploi de caillot de fibrine seule
- emploi de caillot de plasma enrichi en fibrine
- emploi de caillot de plasma naturel

Les résultats peuvent se résumer comme suit :

a) Dans le cas d'une fibrinolyse sous l'effet exclusif de la plasmine, l'enzyme intervient dès le début de la formation du caillot et ceci se traduit, à partir des trois types de caillots standards par un T.E.G. d'amplitude d'abord très faible devenant rapidement nulle.

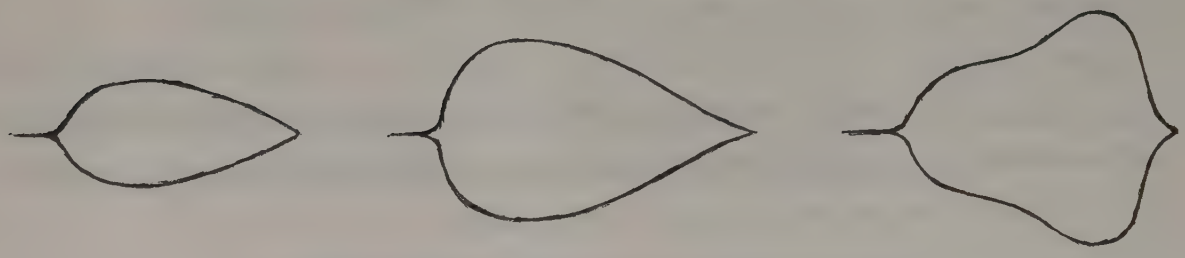
b) Dans le cas d'une fibrinolyse sous l'effet d'activateurs du plasminogène (streptokinase, urokinase) qui n'affectent pas la formation de la fibrine, on observe

. à partir d'un caillot de fibrine seule, l'amplitude du T.E.G. est au début normale, puis brusquement décroît jusqu'à s'annuler très rapidement

. à partir d'un caillot de plasma et de fibrine, l'amplitude décroît moins rapidement, ceci est dû à la présence des antistreptokinases du plasma.

c) L'étude de la fibrinolyse d'un substrat contenant des activateurs a été poursuivie en présence de divers inhibiteurs de la fibrinolyse et en particulier de l'AEAC pour lequel le T.E.G. apparaît sous une forme particulière : l'amplitude, d'abord inférieure à celle du T.E.G. normal, augmente au delà dans la période qui précède la lyse rapide du caillot. Ce phénomène bien que caractéristique de la présence de l'AEAC dans le substrat (252), n'est pour l'instant pas expliqué.

Thromboélastogramme normal



(a) (b) (c)

Thromboélastogrammes dans divers cas de fibrinolyse

Finalement cette technique, prometteuse puisqu'elle devait permettre de suivre le phénomène de la lyse et constituer un moyen de mesure commode du temps de lyse, n'a pas répondu aux espoirs des chercheurs car de trop nombreux paramètres influent sur l'élasticité du caillot et rendent extrêmement difficile, pour l'étude de la lyse, la définition de conditions standard ne dépendant que des quantités d'activateur ou d'inhibiteur ; par ailleurs, les formes et dimensions du T.E.G., pour particulières qu'elles soient en présence d'AEAC, ne varient pas d'une façon suffisamment sensible pour donner lieu à une mesure.

CHAPITRE II

DESCRIPTION DES METHODES ADOPTEES

De l'étude critique des méthodes d'évaluation du pouvoir antifibrinolytique des composés de synthèse, il résulte que celles qui sont basées sur la mesure de la radioactivité du milieu dans lequel a incubé un caillot radioactif, sont les plus susceptibles de conduire à des résultats satisfaisants.

Toutefois nous pensons devoir formuler deux remarques :

- Ces méthodes demandent une mise en œuvre qui semble surtout justifiée lorsqu'il s'agit d'effectuer une étude comparative concernant plusieurs composés.

- Elles présentent l'inconvénient de nécessiter l'emploi dans le milieu réactionnel, de plasminogène, produit d'extraction difficile, ou d'acide thymotique, plus accessible, mais imposant le recours aux protéines sériques, ce qui complique le mode opératoire.

Dans le cadre de notre travail nous avons essayé d'y remédier

- par la mise au point d'un procédé simple, facile à mettre en œuvre, qui permette rapidement de savoir si un composé est doué d'une activité antifibrinolytique ou non.

- par une simplification de la composition du milieu de lyse d'un caillot radioactif.

I - METHODE PAR DILUTION

1° - Principe de la méthode

Les méthodes que nous venons de décrire reposent sur un principe commun : comparer les inhibitions de lyse obtenues avec des quantités identiques d'un inhibiteur étalon puis d'un inhibiteur à doser.

Nous nous proposons ici de rechercher la concentration en inhibiteur à doser provoquant la même inhibition de lyse qu'une concentration déterminée d'un inhibiteur étalon.

Le phénomène de lyse dépend de trois paramètres : du temps, de la concentration en activateur et de la concentration en inhibiteur.

Nous envisageons le processus suivant :

- Pour un inhibiteur étalon on détermine un ensemble de valeurs relatives des trois paramètres qui soit juste suffisant pour conduire à une lyse totale.
- En conservant les valeurs des deux premiers paramètres, on cherchera la concentration de l'inhibiteur à doser provoquant le même phénomène de lyse.

Le problème est alors d'établir la relation entre la concentration d'inhibiteur et le degré d'évolution du phénomène de lyse. Il peut être résolu en observant au même moment, une série de tubes dans lesquels les caillots ont été formés dans des conditions de concentration en inhibiteur variant progressivement d'un tube à l'autre.

Dans le domaine de l'hémostase, le "test de résistance à la streptokinase" (106) est un exemple de méthode par dilution.

2° - Choix de différents paramètres

a) Le substrat solide

On observa la lyse d'un caillot de sang frais qui présente l'avantage d'être facilement formé et pour lequel il est aisé de savoir si oui ou non la lyse a eu lieu (cela n'est pas le cas pour un caillot plasmatique).

b) L'activateur

Nous avons choisi la streptokinase qui est d'un emploi courant.

c) L'agent coagulant

Nous avons retenu la thrombine.

d) Le temps

Nous avons fixé 10 mn parce que c'est un temps suffisant pour être mesuré avec un chronomètre avec une incertitude négligeable ; par ailleurs, il est assez court pour qu'un expérimentateur puisse se consacrer à la surveillance du phénomène et multiplie facilement les essais et, par conséquent, vérifie la bonne reproductibilité des mesures.

e) L'inhibiteur de référence

Nous employons l'acide amino-6 caproïque car c'est un produit courant, qui a une valeur moyenne dans la gamme des inhibiteurs de synthèse ; il a déjà joué le rôle d'inhibiteur de référence dans les études sur le pouvoir antifibrinolytique de nombreux composés.

L'inhibiteur de référence et l'inhibiteur à doser sont employés aux concentrations de 0,15 1,5 15 et 150 millimoles par litre de sérum physiologique, dont on placera 0,1 ml dans le sang utilisé pour la formation de chaque caillot (0,7ml).

3° - Technique

a) Détermination de la concentration en activateur

Il s'agit de déterminer la quantité de streptokinase juste suffisante pour lyser en 10 mn le caillot formé par addition de 1 unité NIH de thrombine à 0,7 ml de sang. On réalise une gamme de caillots contenant des quantités croissantes de streptokinase et on retient la plus faible quantité ayant provoqué la lyse ; en général elle est de l'ordre de 20 à 25 U.I. dans 0,1 ml d'une solution dans le sérum physiologique.

Cette détermination doit être effectuée pour chaque nouveau sang frais ou chaque nouveau mélange de sang frais.

b) Gamme témoin avec l'AEAC

On réalise une gamme de quatre tubes à hémolyse contenant

0,7 ml de sang				
0,1 ml d'AEAC dosé à	0,15	1,5	15	150 mM/l
0,1 ml d'une sol. de streptokinase (200 à 250 U.I./ml)				
0,1 ml d'une sol. de thrombine (10 U.N.I.H./ml)				
après 10 mn à 37° on note la présence (+) ou l'absence (o) de caillot	o	o	+	+

On vérifie que le caillot est lysé dans les deux premiers tubes mais qu'il est encore formé dans les deux tubes suivants. Si le seuil de lyse est déplacé d'un rang, d'un côté ou de l'autre, on recommence en modifiant en conséquence la concentration de la solution de streptokinase.

Dans tous les cas, avant d'effectuer toute mesure, on détermine la quantité de streptokinase capable de lyser le caillot avec les deux faibles doses d'AEAC, mais donnant un caillot avec les deux fortes doses.

c) Gamme de mesure avec l'inhibiteur à doser

On réalise une nouvelle gamme en retenant les mêmes quantités de streptokinase et de thrombine, mais en remplaçant les solutions d'AEAC par les solutions, aux mêmes concentrations molaires, du composé dont on recherche un éventuel pouvoir antifibrinolytique.

Après 10 mn à 37°, on note la présence ou l'absence de caillot.

4° - Interprétation des résultats

Des résultats de ces observations on tire, pour le composé étudié, les conclusions suivantes :

0,15	1,5	15	150	
o	o	o	o	: aucun pouvoir inhibiteur
o	o	o	+	: pouvoir inhibiteur environ 10 fois plus faible que celui de l'AEAC
o	o	+	+	: pouvoir inhibiteur comparable à celui de l'AEAC
o	+	+	+	: pouvoir inhibiteur environ 10 fois plus fort que celui de l'AEAC

5° - Reproductibilité

Dans les expériences faites à partir d'un même sang pour lequel on emploie une même solution de streptokinase, les résultats sont identiques ; nous avons cependant toujours multiplié les essais pour éliminer les résultats incertains qui ne représentent toutefois pas plus du dixième des cas.

Si l'on compare entre eux les résultats de séries d'expériences effectuées avec des sangs différents mais pour lesquels les solutions de streptokinase ont été soigneusement ajustées, on constate que les résultats sont concordants.

6° - Essai de sensibilisation de la méthode - Limites

L'évaluation du pouvoir inhibiteur, telle qu'elle vient d'être exposée (pouvoir comparable, 10 fois plus fort ou 10 fois plus faible), est une appréciation grossière.

Théoriquement elle peut être affinée par l'emploi d'une gamme plus complète de concentrations des inhibiteurs.

Pour ne pas consommer inutilement une grande quantité de sang, la sensibilisation de la méthode ne peut être recherchée que pour des composés déjà reconnus comme actifs, et l'augmentation du nombre des dilutions ne concerne que l'intervalle limite.

Par exemple pour des composés ayant un pouvoir inhibiteur comparable à celui de l'AEAC nous avons employé les concentrations

1,5 5 10 15 mM/l

mais pour obtenir encore, avec l'AEAC, la lyse dans les deux premiers tubes et un caillot dans les deux autres, il est possible que la quantité de streptokinase ait à être réajustée. Le résultat, plus précis, est cependant encore reproductible.

Si l'on multiplie encore les concentrations de la nouvelle zone limite, on se heurte à la difficulté d'appréciation de la lyse ; en effet il n'y a plus de transition nette entre deux tubes voisins.

En conclusion cette méthode doit être limitée à la recherche d'un pouvoir antifibrinolytique et à son évaluation en première approximation.

II - METHODE PAR COMPTAGE DE LA RADIOACTIVITE

1° - Principe de la méthode

Le principe est celui de toute méthode faisant appel à une mesure de radioactivité :

- former un caillot radioactif
- le placer dans une solution comportant
  - . un système d'activation de la lyse
  - . un inhibiteur de référence ou l'inhibiteur à doser
- mesurer, dans les deux cas, la radioactivité libérée en un temps donné et comparer les résultats.

La modification que nous apportons, dans un but de simplification, se situe au niveau du système d'activation de la lyse.

2° - Etude d'un nouveau système d'activation de la lyse

a) Première constatation

En analysant les principales techniques faisant appel à la radioactivité, on note que l'obtention de résultats reproductibles exige un "lavage" du caillot pour éliminer toute radioactivité n'appartenant pas au substrat solide. Ce processus est long et le caillot doit donc pouvoir "attendre" avant que la lyse soit déclenchée. Cette condition rend impossible la coagulation avec emprisonnement de streptokinase car la lyse commencerait immédiatement.

b) Deuxième constatation

La streptokinase, employée à l'extérieur du caillot, est insuffisante pour lyser un caillot préformé. En effet, nous avons observé qu'un caillot plasmatique, placé dans une solution de streptokinase, subit une lyse très lente qui n'atteint que 20 % du caillot en 48 heures et qui n'évolue guère plus par la suite.

Sans l'avoir mentionné explicitement, c'est sans doute pour cette raison que DUDOK de WIT (244) et E. DEUTSCH et col. (246) avaient enrichi le plasma en plasminogène avant de provoquer sa coagulation ; l'expérience a montré que cette addition permet à la streptokinase externe d'être suffisamment efficace.

W. BAUMGARTEN et col. (132) ont proposé l'emploi peu commode d'acide thymotique et de protéines sériques.

c) Proposition d'un processus nouveau

L'idée d'ajouter du plasminogène est à retenir, mais son extraction très difficile est un handicap pour la méthode.

Par ailleurs, nous constatons que ce produit, laborieusement obtenu est, dans le cas de ce dosage, replacé dans le milieu très complexe du plasma.

Nous nous sommes alors demandé s'il ne serait pas possible d'isoler facilement une fraction de plasma contenant le plasminogène, parmi d'autres composants, mais à condition que ces derniers ne soient pas gênants pour l'usage auquel est destiné le plasminogène.

Un culot d'euglobulines paraît correspondre à la définition que nous venons de donner. En effet, outre les euglobulines, le précipité que l'on obtient facilement par légère acidification et centrifugation renferme le système plasminogène-activateurs. Divers autres facteurs, dont certains mal définis, accompagnent le plasminogène ; on pourrait craindre de négliger leur importance mais nous remarquons :

- que si l'on ajoute au plasma qui sera coagulé, un culot d'euglobulines formé à partir d'une autre fraction du même plasma, on n'apporte pas de composants nouveaux, seule la concentration de certains composants sera augmentée.

- qu'il a été constaté (236) que la présence ou l'absence d'euglobulines ne change pas le phénomène de lyse de la fibrine, ni son inhibition.

-que l'opération se résume à une diminution des inhibiteurs naturels par rapport aux activateurs naturels. En effet, en recueillant le culot d'euglobulines d'une fraction de plasma, on élimine les inhibiteurs sériques qui restent en solution, alors que l'on retient le système plasminogène-activateurs ; en ajoutant ce culot à une autre fraction de plasma on provoque son enrichissement en système plasminogène-activateurs alors que les inhibiteurs sériques ne sont pas augmentés.

Finalement, après coagulation, on dispose d'un substrat solide naturel, formé à partir d'un milieu dont le taux des inhibiteurs sériques est inférieur aux valeurs normales. Une telle conjoncture nous paraît particulièrement appropriée

au dosage des inhibiteurs synthétiques puisqu'ils sont justement destinés à être employés lorsque les inhibiteurs naturels sont insuffisants.

d) Détermination de la quantité d'euglobulines

A titre d'essai nous avons ajouté, au plasma destiné à être coagulé, le culot d'euglobulines provenant

- d'une égale quantité de plasma : soit pour le taux de plasminogène une multiplication par 2
- d'une quantité double de plasma : soit une multiplication par 3
- d'une quadruple quantité de plama : soit une multiplication par 5

Nous avons constaté qu'un caillot ainsi formé, immergé dans une solution de streptokinase, est l'objet d'une lyse très accélérée et beaucoup plus complète que celle d'un caillot non enrichi. Toutefois la vitesse et le pourcentage de lyse sont à peu près les mêmes dans les trois cas : environ 80 % de lyse en 4 heures dans une solution de streptokinase à 20 U.I./ml.

Nous opérerons en ajoutant au plasma un culot d'euglobulines provenant d'une égale quantité du même plasma ; nous doublerons donc le taux de plasminogène.

Remarque

Nous constatons donc que dans les mêmes conditions, alors qu'un caillot non enrichi en plasminogène n'est pratiquement pas lysé, un caillot dont le taux de plasminogène a été doublé est très rapidement lysé d'une façon quasi complète.

Cela pourrait signifier que, dans nos conditions de lyse, entre le taux normal et le taux double de plasminogène se situent le seuil minimum d'efficacité et le seuil de saturation du système plasminogène-activateurs. Cette hypothèse est provisoire et il semble intéressant d'approfondir l'explication du phénomène. Une telle étude sera effectuée ultérieurement ; les conclusions auxquelles elle pourra conduire sont de toute façon en dehors de notre sujet.

3° - Choix des différents paramètres

a) le substrat

Nous employons un caillot plasmatique, comme les différents auteurs qui ont fait appel aux méthodes par mesure de radioactivité, qui sont longues et demandent des manipulations du substrat solide qui doit donc être le plus homogène possible. Avant la coagulation, le plasma est enrichi en fibrinogène marqué à l'iode I^{125} (50 µcuries dans 30 ml de plasma).

b) le culot d'euglobulines

On l'obtient par action d'une solution d'acide acétique à 1 %. C'est le mode opératoire habituel.

c) l'agent coagulant

Son choix n'a pas une grande importance car nous avons essayé différentes possibilités (thrombine seule, thrombine et chlorure de calcium) sans observer de différence. Nous utiliserons une solution de chlorure de calcium M/40.

Nous avons retenu la coagulation autour d'une tige de verre, comme l'avait proposé DUDOK de WIT (244).

d) l'inhibiteur de référence

Comme dans la méthode précédente nous employons l'acide amino-6 caproïque.

e) l'activateur

Dans le milieu de lyse (1 ml) on introduit 0, 1 ml d'une solution de streptokinase à 2000 U. I. /ml de sérum physiologique.

f) le temps

Le temps n'est pas fixé à priori ; la lyse de tous les caillots est arrêtée lorsque les caillots témoins, dans un milieu sans inhibiteur, sont lysés en quasi totalité (environ 4 heures).

4° - Technique de la détermination du pourcentage de lyse

A la fin du temps de lyse, on se trouve en présence d'un caillot partiellement lysé qui est encore immergé dans le milieu liquide. Il s'agit de compter séparément la radioactivité du caillot et celle de la phase liquide.

Si l'on enlève seulement le caillot, une partie de la phase liquide (radioactive) qui l'imprègne est entraînée et fausse les mesures. On effectue donc un nouveau "lavage" en immergeant le caillot pendant 2 heures dans une solution tampon qui sera ensuite ajoutée à la phase liquide dans laquelle a eu lieu la lyse.

Soient R_L la radioactivité de la phase liquide

R_C la radioactivité du caillot

Le pourcentage de lyse est donné par le rapport :

$$\% \text{ de lyse} = \frac{R_L}{R_L + R_C} \cdot 100$$

5° - Incertitude de la valeur du pourcentage de lyse

Pour déterminer le pourcentage de lyse par le rapport ci-dessus, il n'est pas théoriquement nécessaire que tous les caillots aient au départ une radioactivité identique. Toutefois, un écart de la radioactivité d'un caillot par rapport à la radioactivité moyenne, révèle sa nature différente de celle de l'ensemble des caillots ; pour avoir un ensemble de caillots homogène, nous avons donc effectué un comptage systématique avant toute série de mesure et écarté tous les caillots dont la radioactivité différait de plus de 10 % de la valeur moyenne.

Dans une même série de mesures, effectuées à partir de caillots provenant d'un même plasma, chacune a été effectuée en triple : trois caillots sont placés dans des conditions de lyse identique. Cette précaution permet d'écarter dans certains cas une valeur aberrante et d'évaluer l'incertitude sur le pourcentage de lyse à 5 % environ.

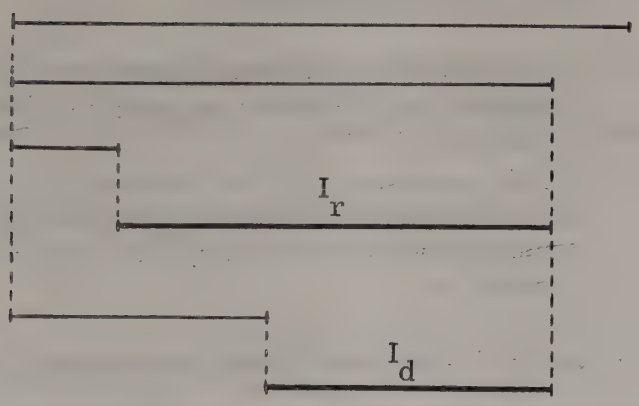
6° - Détermination des propriétés antifibrinolytiques à partir des valeurs de pourcentage de lyse

Dans chacune des méthodes décrites, les possibilités sont limitées à la détermination d'un pourcentage de lyse. C'est à partir de ce résultat obtenu, d'une part avec un inhibiteur de référence, d'autre part avec un inhibiteur à doser, que l'on peut tenter d'attribuer une valeur relative à l'inhibiteur à doser.

Deux méthodes simples de calcul peuvent être envisagées :

a) Méthode de comparaison des "pourcentages d'inhibition" obtenus à partir de quantités identiques des différents inhibiteurs

On peut en schématiser le principe de la façon suivante :



substrat protéique

% de lyse sans inhibiteur

% de lyse avec l'inhibiteur de référence

% "d'inhibition" dû à l'inhibiteur de référence

% de lyse avec l'inhibiteur à doser

% "d'inhibition" dû à l'inhibiteur à doser

- Si l'inhibiteur de référence et l'inhibiteur à doser ont été employés en quantités égales et dans des conditions identiques,
- Si l'on convient de donner la valeur 100 au pouvoir antifibrinolytique de l'inhibiteur de référence,

on peut attribuer une valeur x au pouvoir antifibrinolytique de l'inhibiteur à doser à partir de l'égalité :

$$\frac{Ir}{Id} = \frac{100}{x}$$

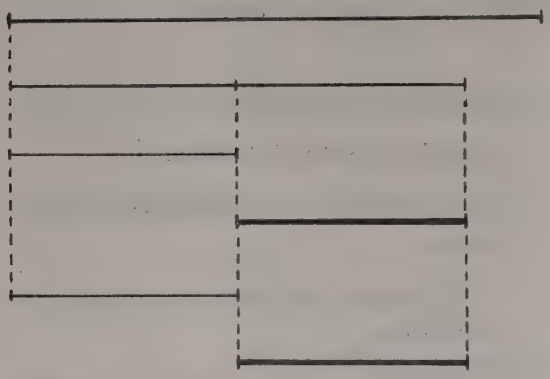
Mais cela suppose une relation linéaire entre le pouvoir antifibrinolytique et le "pourcentage d'inhibition" de lyse ; elle n'existe que pour des pourcentages d'inhibition de valeur voisine et limite donc l'emploi de la méthode à des inhibiteurs de pouvoirs antifibrinolytiques comparables.

Nous avons suivi cette méthode de calcul en opérant de façon telle qu'à chaque expérience, le pourcentage de lyse sans inhibiteur ait une valeur élevée (75 à 90 %).

Nous avons effectué deux séries de comparaison du pourcentage d'inhibition : inhibiteur de référence et inhibiteurs à doser employés en solution à 10^{-1} ou 10^{-2} mole/l (soit dans le milieu de lyse à une concentration de 10^{-2} puis 10^{-3} mole/l).

b) Méthode de comparaison des quantités des différents inhibiteurs entraînant des pourcentages d'inhibition identiques

On peut en schématiser le principe de la façon suivante :



substrat protéique

% de lyse sans inhibiteur

50 % d'inhibition de lyse obtenue avec un inhibiteur de référence employé à la concentration Cr

50 % d'inhibition de lyse obtenue avec un inhibiteur à doser employé à la concentration Cd

Si l'on convient de donner la valeur 100 au pouvoir antifibrinolytique de l'inhibiteur de référence, on peut attribuer une valeur x au pouvoir antifibrinolytique de l'inhibiteur à doser à partir de l'égalité

$$Cr \cdot 100 = Cd \cdot x$$

Elle suppose l'identité rigoureuse entre les deux inhibitions de lyse comparées ; c'est pour obtenir le maximum de sensibilité que l'on choisit une valeur moyenne de l'inhibition (50 % par exemple). On ne peut observer une inhibition de lyse d'une valeur définie a priori, qu'à la condition de faire appel à une gamme de dilutions. On prépare par exemple les deux gammes suivantes :

Gamme de l'inhibiteur de référence

concentration Cr (unité : 10^{-3} mole / l)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
après le temps t % d'inhibition de lyse	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	P_6	P_7	P_8	P_9	P_{10}

Gamme de l'inhibiteur à doser

concentration Cd (unité : 10^{-4} mole/l)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
après le temps t % d'inhibition de lyse	P'_1	P'_2	P'_3	P'_4	P'_5	P'_6	P'_7	P'_8	P'_9	P'_{10}

A partir de ces deux gammes on relèvera par exemple les deux valeurs

$$P_4 = P'_6 = 50\ \%\ \text{d'inhibition}$$

et l'on écrira

$$4.10^{-3} \,.\, 100 = 6.10^{-4} \,.\, x$$

$$x = 100 \,.\, \frac{4.10^{-3}}{6.10^{-4}} = 750$$

Il est laborieux de réaliser, en double ou triple exemplaire, les gammes de dilution appropriées, mais l'avantage de la méthode est de permettre la comparaison de composés doués de propriétés antifibrinolytiques de valeurs très différentes.

Nous n'avons fait appel à cette méthode que pour l'acide αaminocamphorique et pour l'acide dl cis (diméthyl-2,2' αaminoéthyl-3) cyclobutane acétique.

Chapitre II - PARTIE EXPERIMENTALE

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE LA METHODE PAR DILUTION

Le sang employé est un mélange de sang frais provenant de cinq à huit donneurs bénévoles à qui on prélève une quantité de 20 ml environ. Un caillot est formé, dans des conditions qui vont être définies, sous l'action de la thrombine. La mesure consiste à déterminer, après 10 mn, si le caillot existe toujours ou s'il est lysé.

La technique du crochet de verre, employé pour les mesures des paramètres de la coagulation, a donné de mauvais résultats ; la meilleure technique consiste à renverser le tube sur un plateau recouvert de quelques épaisseurs de gaze hydrophyle.

- si le caillot est formé, il reste sur les compresses, la phase liquide est absorbée par le tissus et le caillot isolé du milieu de lyse n'évolue plus
- si le caillot est lysé, il n'y a qu'une phase liquide, en totalité absorbée par le tissus
- si on a l'impression d'avoir à faire à un caillot à un stade intermédiaire, on le laisse 5 ou 10 mn sur les compresses et on refait l'observation. De toute façon cette deuxième observation est une très bonne confirmation de la première appréciation.

Si l'on essaie de pratiquer cette méthode à partir d'un caillot de plasma, la distinction entre caillot formé et caillot lysé est beaucoup plus difficile à établir : en effet en quelques minutes, dans tous les cas, le caillot qui est beaucoup plus fluide, disparaît dans l'épaisseur du tissus et l'on ne peut avoir confirmation de la première appréciation.

1° - Détermination de la concentration de la solution de streptokinase

On réalise une série de tubes constituée comme suit :

		1	2	3	4	5	6	7	8
sang	0,7 ml								
sérum physiologique	0,1 ml								
*sol. de streptokinase dosée en U. I./ml à	0,1 ml	10	100	200	250	300	350	400	500
*sol. de thrombine à 10 U.N.I.H/ml	0,1 ml								
après 10 mn à 37° caillot présent (+) caillot lysé (o)		+	+	+	o	o	o	o	o

Avec les résultats donnés ci-dessus en exemple, on retiendrait pour la suite, la solution de streptokinase à 250 U.I./ml de sérum physiologique.

2° - Gamme de référence

On réalise et on observe une gamme de tubes constituée comme suit :

sang	0,7 ml				
AEAC en sol. physiologique dosée en mM/l à	0,1 ml	0,15	1,5	15	150
Streptokinase en sol. phys. dosée à 250 U.I./ml	0,1 ml				
Thrombine en sol. aqueuse dosée à 10 U.N.I.H./ml	0,1 ml				
après 10 mn à 37° caillot présent (+) caillot lysé (o)		o	o	+	+

Si l'on n'obtient pas le résultat ci-dessus on recommence en employant une solution de streptokinase.

- plus concentrée si l'on a obtenu o + + +
- moins concentrée si l'on a obtenu o o o +

de façon a bien obtenir la lyse dans les deux premiers tubes et un caillot dans les deux suivants.

3° - Gamme de mesure

On procède exactement comme pour la gamme de référence mais la solution d'AEAC est remplacée par la solution du composé dont on recherche l'activité antifibrinolytique. S'il s'agit d'un chlorhydrate la solution est neutralisée et ajustée à pH = 7,35.

.....

* Il nous a semblé particulièrement commode d'utiliser les conditionnements de streptokinase et de thrombine proposés par la Société BEHRINGWERKE A. G. (Laboratoires HOECHST dépositaires) pour la réalisation du "Test de résistance à la streptokinase".

II - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE LA METHODE PAR MESURE DE LA RADIOACTIVITE

1° - Préparation du caillot

Le sang employé est un mélange de sang frais provenant de cinq à huit donneurs bénévoles à qui on a prélevé 20 ml environ. Le plasma est séparé par centrifugation à 1500 tours / mn pendant 10 mn, il est divisé en deux parties égales.

a) Préparation du culot d'euglobulines (première partie du plasma)

On constitue une gamme de tubes de plastique dans lesquels on place successivement

0,5 ml de plasma
9,3 ml d'eau
0,2 ml d'acide acétique à 1 %

Puis on centrifuge à 4° à 6000 tours /mn pendant 15 mn. Il se forme un culot blanchâtre d'euglobulines , le surnageant est éliminé ; l'intérieur du tube, au dessus du culot, est séché à l'aide d'une compresse montée ou par retournement pendant plusieurs mn.

b) Préparation du plasma enrichi en fibrinogène marqué (deuxième partie du plasma)

Le fibrinogène marqué à l'iode I^{125} est livré par le Centre National de Transfusion Sanguine (Laboratoire des Radio-Isotopes).

Un flacon contient 1 ml de fibrinogène qui possède une radioactivité de 100 μcuries ; on ajoute 0,5 ml de cette solution dans 30 ml de plasma. Cette nouvelle solution radioactive est agitée doucement.

c) Formation du caillot

- Chaque culot d'euglobulines est repris par 0,5 ml de plasma radioactif et agité doucement jusqu'à dissolution ; puis la solution est versée dans un tube à hémolyse en verre de 5 ml.
- On ajoute 0,5 ml d'une solution de chlorure de calcium M/40 et on plonge jusqu'au fond une tige de verre * maintenue dans l'axe du tube.
- Tous les tubes sont placés pendant 1 heure dans unbain marie à 37°. Au bout de ce temps la coagulation a eu lieu et le caillot est rétracté. En maintenant le tube penché et en imprimant à la tige de verre un mouvement circulaire, parallèlement à la paroi intérieure du tube, on détache le caillot qui reste solidaire de la tige de verre.

d) Lavage du caillot

- Chaque caillot porté par la tige de verre est introduit dans un autre tube contenant 1 ml de tampon véronal-acétate * *.
- Tous les tubes ainsi préparés sont maintenus pendant une nuit à 4°. Après cette immersion les caillots se trouvent "lavés" de toute radioactivité n'appartenant pas au substrat solide.

2° - Lyse du caillot

a) Préparation des milieux de lyse

On constitue une série de tubes de plastique de 5 ml, numérotés, et dans lesquels on introduit :

0,8 ml de solution tampon véronal-acétate
0,1 ml d'une solution de streptokinase à 2000U.I./ml de sérum physiologique
0,1 ml
- d'une solution tampon dans les tubes témoins
- d'une solution d'AEAC dans les tubes de référence
- d'une solution d'inhibiteur à doser dans les tubes de mesure.

(deux concentrations sont employées pour l'AEAC et pour les inhibiteurs: 10^{-1} et 10^{-2} mole / l de solution tampon).

b) Conduite de la lyse - Lavage du caillot

- Un caillot est immergé dans chaque tube.
- Tous les tubes sont maintenus au bain marie à 37° pendant 4 heures. On vérifie alors que la lyse des caillots dans les tubes témoins, qui ne contiennent pas d'inhibiteur, est pratiquement totale.
- On réalise une série de tubes numérotés de façon identique, on introduit dans chacun d'eux
  - 1 ml de solution tampon
  - le caillot qui reste dans le tube de la première série qui porte le même numéro.
- Les tubes qui contiennent les caillots sont maintenus à 4° pendant 2 heures. La solution dans laquelle ils ont été immergés est versée dans le tube de même numéro contenant le milieu où a été effectuée la lyse.

La solution constituée par la réunion de ces deux phases liquides contient toute la radioactivité libérée par la lyse du caillot.

- Le caillot est laissé dans le tube de lavage qui ne contient plus de liquide.

3° - Comptage de la radioactivité - Pourcentage de lyse

- Les tubes qui contiennent la phase liquide sont placés dans un appareil de mesure de rayonnement radioactif. On note le nombre de coups par minute enregistré par l'appareil, soient R_{L1}, R_{L2}, ... ces valeurs
- Tous les tubes qui contiennent les caillots sont également placés dans l'appareil. Soient R_{C1}, R_{C2}, ... les valeurs notées.
- Le pourcentage de lyse du caillot placé dans le tube n° 1 a pour valeur

$$P_1 = \frac{R_{L1}}{R_{L1} + R_{C1}} \cdot 100$$

* La tige de verre est facilement constituée par un tube à hématocrite dont on ferme, à la flamme, une des extrémités (celle qui plongera dans le plasma). Pour la placer dans l'axe du tube nous avons opéré comme suit :

- un couvercle en plastique de godet d'autoanalyseur TECHNICON est percé en son centre (pointe chaude ou poinçon)
- la tige de verre est enfilée en forçant dans ce trou
- Lors de l'addition de la solution recalcifiante, le couvercle de plastique est placé sur l'ouverture du tube à hémolyse (il s'y adapte grossièrement).

On fait glisser la tige dans ce trou jusqu'à ce que son extrémité fermée touche le fond du tube qui est sphérique.

La tige se trouve placée selon l'axe du tube car elle est maintenue en haut au centre de l'ouverture par le couvercle, en bas au centre du fond en touchant le fond de la partie sphérique.

** Le tampon véronal-acétate est préparé de la façon suivante :

- solution- mère : acétate de sodium $CH_3COONa, 3H_2O$ 9,714 g
  diéthylbarbiturate de sodium 14,714 g
  eau pour préparation injectable q. s. 500 ml

- solution à employer :
  solution-mère 50 ml
  solution de chlorure de sodium à 9‰ 900 ml
  solution d'acide chlorhydrique 0,1 N 45 ml

ajuster le pH à 7,4 ± 0,05

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Nous donnerons et analyserons tout d'abord les résultats relatifs à la recherche du pouvoir antifibrinolytique de divers composés. Nous rapporterons ensuite et discuterons les valeurs relatives obtenues pour les dérivés actifs ; pour deux d'entre eux nous envisagerons l'hypothèse d'un emploi thérapeutique.

Les figures et tableaux sont groupés en fin de chapitre pages 163 à 168.

I - RECHERCHE DU POUVOIR ANTIFIBRINOLYTIQUE DE DIVERS COMPOSES DE SYNTHESE (TABLEAU VI)

Nous avons énoncé plus haut (p. 44 à 47), les raisons pour lesquelles il nous semblait intéressant de rechercher l'éventuel pouvoir inhibiteur de certains composés non encore étudiés sous cet angle. Nous avons utilisé la méthode de dilution que nous avons mise au point (page 132) ; rappelons que la mesure consiste à définir si, dans des conditions déterminées, le caillot est lysé (o) ou reste formé (+).

Le tableau VI rassemble nos résultats.

Remarques :

a) Nous donnons ici une appréciation nuancée au sujet de l'existence du caillot (+, ++ ou +++). Elle tient compte

- de la consistance et de la taille du caillot qui, dans certains cas, nous ont semblées devoir être prises en considération.
- de la reproductibilité des observations réalisées au cours d'un grand nombre d'expériences.

b) Nous distinguons par le signe * les composés dont nous avons effectué la synthèse ; l'étude de leur préparation a fait l'objet de la deuxième partie de ce travail. A notre connaissance, les composés repérés par le signe ** n'avaient pas encore été préparés.

Commentaires sur le tableau VI

a) Groupe des inhibiteurs de référence

La recherche du pouvoir inhibiteur par la méthode de dilution permet bien de retrouver, pour des inhibiteurs connus, les valeurs attendues :

- l'AMCHA est environ dix fois plus actif que l'AEAC
- la lysine n'a qu'un très faible pouvoir inhibiteur.

b) Groupe des lactames et lactones

Ces composés sont inactifs ; il semble donc inutile, malgré certains travaux déjà cités, de rechercher d'éventuels inhibiteurs dans cette série.

c) Groupe des dérivés du PAMBA

La fonction acide ou la fonction aldéhyde, substituée à la fonction aminométhyle enlève toute activité à la molécule. Il en est de même pour la fonction sulfonamide qui se comporte donc comme une fonction amide.

d) Groupe des diacides aminés

Ils sont tous dépourvus d'activité, excepté le dernier terme, l'acide dl amino - 2 pimélique qui présente un faible pouvoir inhibiteur. Une fois de plus nous constatons le rôle important joué par la longueur de la chaîne.

e) Groupe des dipeptides

La glycyl β - alanine possède un net pouvoir antifibrinolytique. Son isomère, la β - alanyl glycine en est pratiquement dépourvue. Nous reviendrons sur le cas de ces composés.

Nous avons aussi cherché une éventuelle activité des dérivés (acide et ester) que nous avons obtenus en essayant de préparer un isomère des dipeptides, avec les groupes CO et NH inversés. Ces deux composés sont inactifs. Ce résultat ne doit pas surprendre, même dans le cas de la N N' bis (hydroxymalonyl) éthylène diamine ; en effet, s'il existe dans la molécule les NH en position 6 par rapport à un COOH, il s'agit en fait de NH amidiques qui, cela a déjà été constaté, ne conservent pas l'activité des fonctions amine.

f) Groupe des ε aminoacides cycliques

Nous trouvons dans ce groupe plusieurs composés possédant un pouvoir antifibrinolytique intéressant, égal ou supérieur à celui de l'AEAC.

Nous remarquons tout d'abord que la forme sous laquelle se présente le composé (forme libre, chlorhydrate ou hydrate) n'influence pas sa réactivité. Par la suite nous ne retiendrons donc qu'une forme par composé : la forme libre, ou à défaut l'hydrate, en évitant le chlorhydrate qui impose la neutralisation de la solution.

Nous constatons ensuite que

- les deux acides aminocampholiques ont un comportement nettement différent : le composé α est un inhibiteur actif, le composé β l'est beaucoup moins. La raison de cette différence nous échappe pour l'instant.

- l'acide dl cis (diméthyl - 2,2 ∝aminoéthyl - 3) cyclobutane acétique est aussi actif que l'acide ∝ aminocampholique ; l'isomère trans est moins actif.

- l'(hydroxycarbonyl - 2 aminométhyl-2') diphényle est dépourvu d'activité. Il s'agit pourtant d'un acide aminé à cinq maillons carbonés entre la fonction acide et la fonction amine. L'encombrement des noyaux aromatiques ne semble pas suffisant pour expliquer le manque d'activité ; la notion de distance que nous envisagerons plus loin nous fournira peut-être une explication.

- l'acide amino - 6 pénicillanique, bien que possédant la fonction amine en position 6 par rapport à l'acide, n'a pas d'activité ; ce qui est dû vraisemblablement à la liaison directe du groupe NH_2 sur le cycle et aux propriétés particulières de la structure bicyclique.

II - DETERMINATION DU POUVOIR INHIBITEUR DES COMPOSES POSSEDANT DES PROPRIETES ANTIFIBRINOLYTIQUES (TABLEAU VII)

1° - Résultats

Les composés pour lesquels nous avons trouvé une activité antifibrinolytique ont fait l'objet d'une étude par la méthode de mesure de la radioactivité. Nous avons déterminé et comparé les pourcentages de lyse de caillots identiques placés en présence d'inhibiteurs différents, ils sont inversement proportionnels à l'activité de l'inhibiteur et permettent une classification des composés étudiés. Mais on est aussi tenté, à partir des valeurs du pourcentage de lyse, d'attribuer une valeur numérique au pouvoir inhibiteur de chaque substance. Nous rapportons dans le tableau VII les valeurs des pourcentages de lyse et les valeurs du pouvoir inhibiteur que l'on peut en déduire par les calculs indiqués pages 141 à 143.

Remarque sur l'incertitude du calcul par comparaison des % de lyse

La méthode de mesure du % de lyse donne un résultat connu avec une bonne précision, mais le calcul que l'on fait à partir de cette mesure entraîne une grande augmentation de l'incertitude relative :

Par exemple si $\frac{\Delta x}{x} = \frac{3}{100}$

pour y qui est de la forme $y = \frac{x - x'}{x}$

$$\frac{\Delta y}{y} = \frac{\Delta x + \Delta x'}{x - x'} + \frac{\Delta x}{x}$$

pour une valeur $(x - x') = (75 - 15) = 60$

$$\frac{\Delta y}{y} = \frac{3 + 3}{60} + \frac{3}{100} = \frac{10}{100} + \frac{3}{100} = \frac{13}{100}$$

et pour z qui est de la forme $z = 100 \frac{y}{y'}$

$$\frac{\Delta z}{z} = \frac{\Delta y}{y} + \frac{\Delta y'}{y'} = \frac{13}{100} + \frac{13}{100} = \frac{26}{100}$$

On constate donc que même avec une incertitude très faible (3%) sur le pourcentage de lyse, la valeur du pouvoir antifibrinolytique que l'on peut en déduire est affectée d'une importante incertitude (25%).

C'est pourquoi nous avons effectué plusieurs expériences et n'avons retenu, pour chaque inhibiteur, que les résultats qui conduisent à des valeurs de z voisines entre elles.

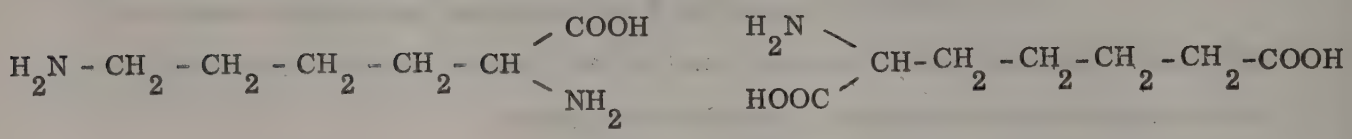
2° - Discussion sur les propriétés antifibrinolytiques de l'acide dl amino - 2 pimélique - Intérêt pour la recherche du mécanisme de l'inhibition de la fibrinolyse.

Nous constatons que l'acide dl amino - 2 pimélique a une faible activité antifibrinolytique, il ne peut être intéressant de ce point de vue mais la connaissance de ce résultat revêt cependant un intérêt pour la recherche du mécanisme de l'inhibition de la fibrinolyse.

On peut rapprocher la modification moléculaire qui fait passer de l'AEAC à l'acide dl amino - 2 pimélique, de la modification qui fait passer de l'AEAC à la lysine

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH$$

AEAC



Lysine — acide dl amino - 2 pimélique

- Quand on compare les activités de ces deux composés on constate que si l'on conserve une des deux fonctions acide et amine de l'AEAC et que l'on remplace l'autre des deux fonctions par le groupement - CH (NH_2) - COOH, le résultat est le même dans les deux cas = perte de 90 % de l'activité.

On peut déduire que, sur le plan de l'activité de l'AEAC, la fonction acide et la fonction amine jouent chacune un rôle d'égale importance. Cela constitue une nouvelle raison de penser qu'un inhibiteur de la fibrinolyse doit être un acide aminé.

- On peut aussi observer que la présence d'un groupe - COOH en α de la fonction - NH_2, ou la présence d'un groupe - NH_2 en α de la fonction - COOH, diminue de façon équivalente l'efficacité de la molécule initiale. Cela constitue une nouvelle raison de penser que, sur le substrat, la molécule d'inhibiteur agit par sa fonction acide sur un site amine et par sa fonction amine sur un site acide.

3° - Discussion sur les propriétés antifibrinolytiques de la glycyl β-alanine. Intérêt pour la recherche de la nature des inhibiteurs naturels de la fibrinolyse.

Nous avons envisagé les deux dipeptides caractérisés par une longueur de chaîne égale à celle de l'AEAC.

La β-alanyl glycine est dépourvue d'activité antifibrinolytique ; la glycyl β-alanine est par contre douée d'une activité assez importante, mais inférieure cependant à celle d'autres composés beaucoup plus accessibles. L'utilisation de la glycyl β-alanine est exclue mais son activité revêt toutefois un intérêt pour la recherche de la nature des inhibiteurs naturels de la fibrinolyse.

Dans l'état actuel des connaissances, on ne sait rien de la nature des inhibiteurs normalement présents dans le sang ; on admet cependant que dans certains cas pathologiques ces inhibiteurs sont insuffisants ou absents. L'administration d'un inhibiteur de synthèse, l'AEAC par exemple, restaure le processus de l'inhibition de la lyse, en agissant au niveau du sang (on constate son efficacité in vitro). Mais ni l'AEAC, ni les autres inhibiteurs de synthèse ne sont des composés biologiques ; on suppose cependant que le produit administré vient jouer le rôle de l'inhibiteur naturel anormalement absent. En général les hypothèses s'arrêtent là.

A la lumière de la constatation que nous venons de faire, nous pouvons nous demander, puisque la glycyl β-alanine est un composé biologique si, dans l'organisme, le rôle de l'inhibiteur ne serait pas joué par ce dipeptide ? Les connaissances actuelles ne permettent pas de répondre ; en effet la β-alanine semble occuper un rôle discret dans les processus biologiques et on ne possède pas de renseignements sur celui du dipeptide glycyl β-alanine.

De toute façon, si la question que nous posons schématise trop le problème pour l'instant, il semble cependant intéressant de connaître la nature des inhibiteurs naturels ; la recherche de composés biologiques simples, aux propriétés physico-chimiques bien établies, et doués de propriétés antifibrinolytiques, peut constituer une première approche du problème. Dans cette optique nous pensons que les propriétés antifibrinolytiques de la glycyl β-alanine méritent de retenir l'attention.

Par ailleurs nous avons noté que, des deux dipeptides envisagés, un seul est actif. On ne peut donner ici pour explication une différence de longueur de chaîne, mais il s'agit d'un mécanisme enzymatique dont la spécifité fournit l'explication vraisemblable de ce résultat.

4° - Discussion sur les propriétés antifibrinolytiques de quelques ε - amino acidescycliques - Intérêt pour la recherche de molécules médicamenteuses.

Nous n'avons retenu pour ces essais que les acides amino campholiques, sous forme de dihydrate et l'acide dl cis(diméthyl - 2,2 α aminoéthyl - 3) cyclobutane acétique, sous forme libre.

Nous constatons tout d'abord que pour une concentration de 10^{-2} mole/litre, la lyse est inhibée d'une façon quasi complète, aussi bien par l'acide α campholique, que par l'acide (diméthyl -2,2 α aminoéthyl -3) cyclobutane acétique, que par l'AEAC. En employant les inhibiteurs à la concentration de 10^{-3} mole/litre, le phénomène d'inhibition n'est plus épuisé et l'on constate que l'activité des deux dérivés cycliques dépasse celle de l'AEAC.

Nous notons aussi que l'activité de l'acide β aminocampholique est beaucoup plus faible que celle de l'isomère α. La différence de structure entre les deux isomères se résume au changement de position d'un groupement méthyle qui ne constitue qu'une explication partielle pour la différence d'activité observée.

Pour chacun des deux acides aminés cycliques présentant une activité comparable ou légèrement supérieure à celle de l'AEAC, nous pouvions nous demander dans quelle mesure les distances qui séparent les fonctions acide et amine correspondent à celles qui avaient été jugées critiques dans le cas des composés possédant un cycle à 6 atomes.

Nous avons mesuré les distances interatomiques sur des modèles moléculaires du type DRYDING représentant les composés que nous avons synthétisés (fig. 4) mais aussi leurs stéréoisomères théoriques. Les résultats de ces mesures sont rassemblés dans le tableau VIII qui appelle les commentaires suivants :

- L'acide α aminocampholique cis que nous avons synthétisé, présente une distance entre les groupements fonctionnels, beaucoup plus courte

que celles des composés actifs possédant un cycle à 6 atomes. D'après les distances données par W. BAUMGARTEN et Col. (132) il paraît même paradoxal que l'acide α aminocampholique ait une activité.

L'isomère TRANS ne présenterait pas des distances supérieures, envisager sa synthèse n'offre donc pas d'intérêt.

Pour passer à une molécule dans laquelle la distance entre les groupements fonctionnels serait augmentée on peut envisager deux solutions :

. préparer un composé homologue, mais possédant le radical - CH_2 - CH_2 - NH_2 à la place du radical - CH_2 - NH_2, mais la distance serait alors supérieure à celle que l'on peut souhaiter ; par ailleurs les difficultés de la synthèse lui font perdre son intérêt.

. préparer un composé cyclobutanique possédant les radicaux - CH_2 - CH_2 - NH_2 et CH_2 - COOH. C'est cette solution que nous avons adoptée.

- L'acide dl cis (diméthyl - 2,2 α aminoéthyl - 3) cyclobutane acétique préparé présente une distance entre les groupements fonctionnels très voisine ou égale à celle du meilleur modèle connu. Son activité est cependant beaucoup moins importante. A cela nous pouvons donner deux raisons qui d'ailleurs s'ajoutent vraisemblablement :

. la mobilité des chaînes latérales écarte les groupes fonctionnels de leur position de moindre encombrement qui paraissent les plus souhaitables.

. les trois groupes méthyle augmentent le volume de la molécule qui a ainsi plus de mal à atteindre les sites du substrat.

L'isomère TRANS présente des distances comparables, mais il est de préparation moins aisée et s'est révélé moins actif lors des essais par la méthode de dilution. Il n'a pas été retenu pour des mesures par la méthode radioactive.

- L'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl - 2') diphényle n'est pas actif. Nous avons noté les distances qui correspondent à deux positions remarquables des cycles aromatiques (coplanaires et perpendiculaires). Sans connaître la véritable orientation de ces cycles, nous pouvons cependant penser

que le manque d'activité de la molécule est dû à la distance trop faible qui sépare les groupements fonctionnels et à l'encombrement qu'entraîne la présence des deux noyaux aromatiques.

De cette discussion sur l'activité de nos composés en relation avec la distance qui sépare les groupements fonctionnels nous pouvons retenir que, si la distance est peut être un paramètre lié à l'efficacité, beaucoup d'autres paramètres doivent aussi intervenir et la validité de la notion de distance se limite à des molécules voisines pour lesquelles les autres paramètres conservent des valeurs très proches.

La recherche de propriétés antifibrinolytiques doit donc être aussi envisagée sur des molécules pour lesquelles la distance qui sépare les groupements fonctionnels ne semble pas à priori particulièrement favorable.

III - ETUDE DE L'HYPOTHESE D'UNE UTILISATION THERAPEUTIQUE DE L'ACIDE ∝ AMINOCAMPHOLIQUE ET DE L'ACIDE dl CIS (DIMETHYL - 2,2 ∝ AMINOETHYL - 3) CYCLOBUTANE ACETIQUE

Nous sommes en présence de deux composés qui ont des propriétés antifibrinolytiques comparables ou légèrement supérieures à celles d'un composé largement employé comme médicament, l'AEAC.

Pour chacun d'eux nous pouvons nous poser la question de savoir s'il serait possible d'envisager l'hypothèse de leur utilisation thérapeutique. Plusieurs questions préalables se posent alors.

1° - Les composés, actifs dans le sang in vitro, seraient-ils aussi actifs in vivo ?

Sur ce point on peut répondre par l'affirmative, compte tenu de TOUS les résultats déjà observés avec les autres acides aminés possédant des propriétés antifibrinolytiques.

2° - Les synthèses de ces composés sont-elles plus faciles que celles des autres inhibiteurs de synthèse actuellement employés ?

Sur ce point on doit répondre de façon distincte pour chaque composé.

a) Synthèse de l'acide ∝ aminocampholique

. Le produit de départ a l'avantage d'être un produit naturel extrêmement courant : le camphre.

. Les étapes de la synthèse s'effectuent avec des rendements moyens mais ne présentent aucune difficulté opératoire. En particulier la méthode que nous proposons, par réduction du composé acide - nitrile, conduit directement au produit attendu (et non pas au chlorhydrate), ce qui évite l'emploi des résines échangeuses d'ions auxquelles doivent cependant recourir les méthodes de préparation de l'AEAC et de la plupart des autres antifibrinolytiques.

b) Synthèse de l'acide dl cis (diméthyl - 2,2 ∝ aminoéthyl - 3) cyclobutane acétique

. Le produit de départ est encore très courant puisqu'il s'agit de l'acide pinonique qui dérive très facilement de l' ∝ pinène,

composé naturel présent dans l'essence de térébenthine.

. La préparation ne demande que deux étapes, extrêmement simples s'effectuant avec un très bon rendement.

D'une façon générale, sans procéder à une étude économique approfondie on peut dire que les deux composés envisagés peuvent être aisément et très aisément obtenus à partir de composés naturels très répandus.

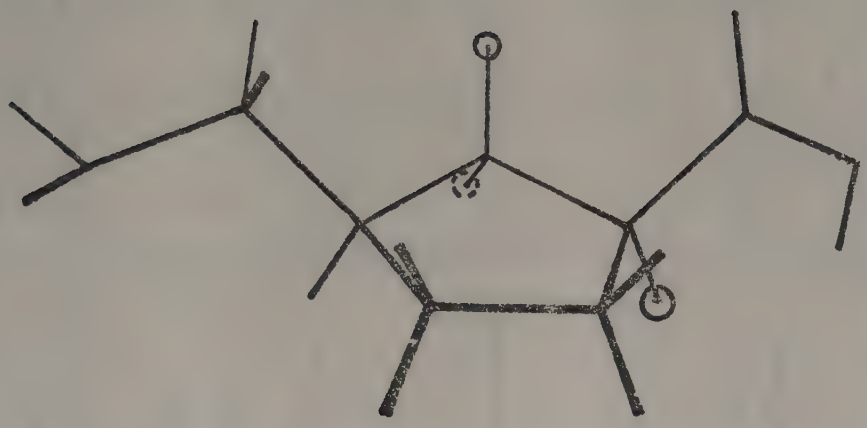
3° - Ces composés ne sont-ils pas toxiques et peut-on envisager leur administration ?

Cette question est évidemment fondamentale. A priori, il n'y a pas de raison de craindre une toxicité puisque l'AEAC ou l'AMCHA, de structures voisines, en sont dépourvus.

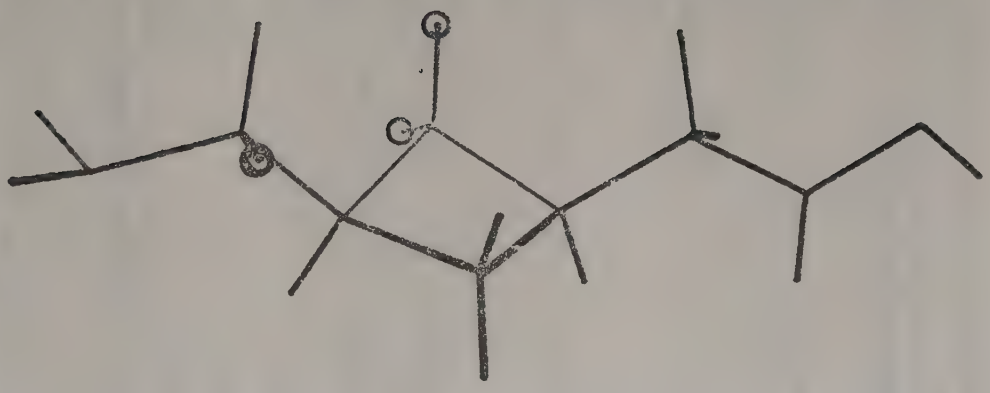
Nous avons toutefois effectué divers essais de tolérance chez la souris et chez le rat (tableau IX).

Les produits en solution dans l'eau ont été administrés par sondage gastrique pendant 6 et 15 jours à des doses quotidiennes 2 et 3 fois supérieures aux doses thérapeutiques maximales de l'AEAC, qui est d'activité comparable. Ni pendant la période d'administration, ni pendant la période d'observation, les animaux n'ont présenté aucun symptome d'intolérance.

Ces essais ne constituent qu'une étude préliminaire, mais les résultats sont encourageants et laissent penser qu'aucun obstacle d'ordre toxicologique ne devrait s'opposer à l'emploi, comme antifibrinolytique, des composés que nous proposons.



(a)



(b)

figure 4 - Modèles moléculaires (représentation perspective)

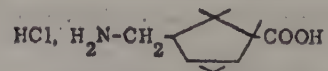
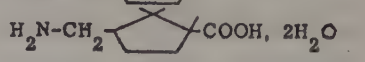
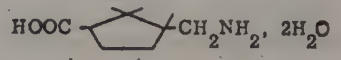
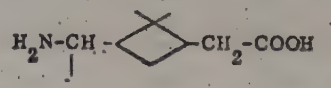
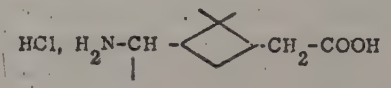
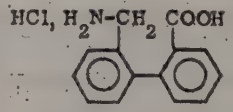
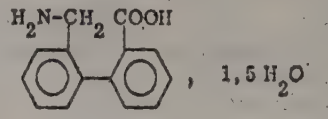
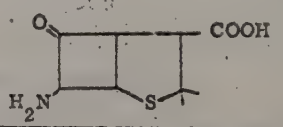
a) acide ∝aminocampholique

b) acide (diméthyl-2,2 ∝aminoéthyl-3) cyclobutane acétique

TABLEAU VI - RESULTATS DE LA RECHERCHE DU POUVOIR ANTIFIBRINOLYTIQUE

GROUPE		COMPOSES NOM	STRUCTURE	Présence ou absence du caillot pour des concentrations en mMole/litre 0,15	1,5	15	150
Inhibiteurs de référence		acide amino-6 caproïque AEAC	$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$	o	o	+++	+++
		acide paraminométhyl cyclohexane carboxylique AMCHA	$H_2N-CH_2-C_6H_{10}-COOH$	o	+++	+++	+++
		lysine	$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	o	o	o	+
lactames, lactones		caprolactame	$HN-(CH_2)_5-C=O$	o	o	o	o
		valérolactame	$HN-(CH_2)_4-C=O$	o	o	o	o
		caprolactone	$O-(CH_2)_5-C=O$	o	o	o	o
		valérolactone	$O-(CH_2)_4-C=O$	o	o	o	o
dérivés du PAMBA		acide téréphthalique	$HOOC-C_6H_4-COOH$	o	o	o	o
		téréphthalaldéhyde	$HC(=O)-C_6H_4-COOH$	o	o	o	o
		acide parasulfonamide benzoïque	$H_2N-SO_2-C_6H_4-COOH$	o	o	o	o
diacides aminés		acide aspartique	$H_2N-CH(COOH)-CH_2-COOH$	o	o	o	o
		acide glutamique	$H_2N-CH(COOH)-(CH_2)_2-COOH$	o	o	o	o
		acide dl amino-2 adipique	$H_2N-CH(COOH)-(CH_2)_3-COOH$	o	o	o	o
	*	acide dl amino-2 pimélique	$H_2N-CH(COOH)-(CH_2)_4-COOH$	o	o	o	++
dipeptides		glycyl β-alanine	$H_2N-CH_2-CO-NH-CH_2-CH_2-COOH$	o	o	++	+++
		β-alanyl glycine	$H_2N-CH_2-CH_2-CO-NH-CH_2-COOH$	o	o	o	+
	**	NN' bis (hydroxymalonyl) éthylène diamine	$(HOOC-CH_2-CO-NH-CH_2-)_2$	o	o	o	o
	**	NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine	$(H_5C_2OOC-CH_2-CO-NH-CH_2-)_2$	o	o	o	o

TABLEAU VI - (suite)

GROUPE		COMPOSES NOM	STRUCTURE	Présence ou absence du caillot pour des concentrations en mMole/litre 0,15	1,5	15	150
ε amino acides cycliques	*	acide ∝ aminocampholique, chlorhydrate		o	+	+++	+++
	**	acide ∝ aminocampholique, dihydrate		o	++	+++	+++
	**	acide β aminocampholique, dihydrate		o	o	+	++
	*	acide dl cis (diméthyl-2, 2 ∝ aminoéthyl-3) cyclobutane acétique		o	++	+++	+++
	*	acide dl cis (diméthyl-2, 2 ∝ aminoéthyl-3) chlorhydrate		o	+	+++	+++
	*	isomère trans chlorhydrate		o	o	++	+++
	**	hydroxycarbonyl-2 aminoéthyl-2' diphényle, chlorhydrate		o	o	o	o
	**	hydroxycarbonyl-2 aminoéthyl-2' diphényle, hydrate		o	o	o	o
		acide amino-6 pénicillanique		o	o	o	o

* composés dont nous avons effectué la synthèse

** composés qui, à notre connaissance, n'avaient pas encore été préparés

TABLEAU VII - RESULTATS DE LA DETERMINATION DU POUVOIR ANTIFIBRINOLYTIQUE

	comparaison des "pourcentages d'inhibition" obtenus à partir de quantités identiques d'inhibiteurs						comparaison des qtés d'inhibiteurs entraînant des % de lyse identiques		
	AEAC et autres inhibiteurs à 10^{-2} mole/litre			AEAC et autres inhibiteurs à 10^{-3} mole/litre			AEAC et autres inhibiteurs donnant 50 % de lyse		
	% de lyse (moyenne) x	% d'inhibition $y = \frac{85 - x}{85} . 100$	pouvoir antifibrinolytique $z = \frac{y}{76,5} . 100$	% de lyse (moyenne) x	% d'inhibition $y = \frac{78 - x}{78} . 100$	pouvoir antifibrinolytique $z = \frac{y}{46} . 100$	conc. inhib. référence Cr	conc. inhib. à doser Cd	pouvoir antifibrinolytique $Z' = \frac{Cr}{Cd} . 100$
aucun inhibiteur	85			78					
AEAC, inhibiteur de référence	20	76,5	100	42	46	100	$8 . 10^{-3}$		100
acide dl amino - 2 pimélique	78,5	7,5	10	76	2,3	5			
glycyl β -alanine	43	49,4	65	53	32	70			
β - alanyl glycine	81	3,8	5	78	o	o			
acide ∝ aminocamphorique, dihydrate	18,7	78	102	24,5	69	150		$5 . 10^{-3}$	160
acide β aminocamphorique, dihydrate	51	40	53	58,3	25,3	55,			
acide dl cis (diméthyl - 2,2 ∝ aminoéthyl - 3) cyclobutane acétique	17,8	79	103	28	64,1	140		$4,5 . 10^{-3}$	180

TABLEAU VIII - DISTANCE ENTRE LES GROUPEMENTS FONCTIONNELS (ANGSTROM)

	distance C_1-C_6		distance C_1-N	
	d. maximum	d. de moindre encombrement	d. maximum	d. de moindre encombrement
acide aminoéthyl - 4 bicyclo octane - 2, 2, 2 carboxylique	5,67	5,67	6,30	6,30
acide ∝ aminocampholique CIS				
équatorial - équatorial	4,90	4,90	6,10	5,60
axial - axial	(3,40)	(3,40)	(4,90)	(4,80)
acide ∝ aminocampholique TRANS				
équatorial - axial	4,80	4,85	6,10	6,10
axial - équatorial	4,70	4,70	5,60	5,60
acide triméthyl - 1, 2, 2 aminométhyl - 3 cyclopentane carboxylique CIS				
équatorial - équatorial	6,20	6,20	7,20	6,60
axial - axial	(4,80)	(4,80)	(5,50)	(5,30)
acide triméthyl - 1, 2, 2 aminométhyl - 3 cyclopentane carboxylique TRANS				
équatorial - axial	6,10	6,10	(7,25)	6,30
axial - équatorial	5,60	5,70	6,80	6,80
acide dl (diméthyl - 2,2 ∝amioéthyl - 3) cyclobutane acétique CIS				
équatorial - équatorial	6,00	5,65	6,80	6,30
axial - axial	(4,80)	(4,80)	(5,80)	(5,60)
acide dl (diméthyl - 2,2 ∝aminoéthyl - 3) cyclobutane acétique TRANS				
équatorial - axial	6,00	5,60	(7,00)	6,30
axial - équatorial	5,50	5,40	(7,00)	6,30
hydroxycarbonyl - 2 aminométhyl - 2' diphényle en fonction de la position des cycles :	coplanaires	perpendiculaires	coplanaires	perpendiculaires
	5,45	4,10	6,80	5,30

( ) Les valeurs entre parenthèses sont théoriques et correspondent à des structures qui vraisemblablement ne peuvent pas exister.

TABLEAU IX - ESSAIS DE TOLERANCE

lots	animaux	administration					observation	Résultat
		produit	durée	concentration	ingestions	dose		
1	6 souris 10 g	I	6 jours	3 mg/ml H_2O	4 fois 0,25 ml	1,5 mM/kg/j	10 jours	AUCUN SYMPTOME D' INTOLERANCE
2	6 souris 10 g	I	6 jours	5 mg/ml H_2O	4 fois 0,25 ml	2,25 mM/kg/j	10 jours	
3	6 souris 10 g	I	6 jours	10 mg/ml H_2O	4 fois 0,25 ml	4,5 mM/kg/j	15 jours	
4	8 souris 10 g	rien	6 jours	-	-	-	15 jours	
5	8 rats 150 g	I	15 jours	12,5 mg/ml H_2O	2 fois 1 ml	7,5 mM/kg/j	15 jours	
6	8 rats 150 g	II	15 jours	12,5 mg/ml H_2O	2 fois 1 ml	7,5 mM/kg/j	15 jours	
7	9 rats 150 g	rien	15 jours	-	-	-	15 jours	

produit I : acide ∝ aminocampholique

produit II : acide dl cis (diméthyl - 2,2 ∝ aminoéthyl - 3) cyclobutane acétique

remarque : la dose thérapeutique de l'AEAC est de 200 à 300 mg/kg/j soit 1,5 à 2,6 m Mole/kg/jour.

RESUME ET CONCLUSIONS

Ce travail a été orienté à la fois vers une meilleure connaissance du phénomène de l'inhibition de la fibrinolyse et vers l'obtention de nouveaux antifibrinolytiques. Nous avons ainsi été conduit à synthétiser plusieurs molécules, dont certaines sont nouvelles.

Nous pouvons résumer nos résultats autour des trois thèmes suivants :

- synthèses
- méthodes d'appréciation de l'activité antifibrinolytique
- nouveaux inhibiteurs de la fibrinolyse.

SYNTHESES

En série linéaire nous avons d'une part, repris la synthèse de l'acide di amino-2 pimélique, et d'autre part nous avons essayé de synthétiser la N (hydroxymalonyl) éthylène diamine. Nous ne sommes pas parvenu à isoler ce composé qui d'ailleurs n'est pas connu. Toutefois les réactions mises en œuvre ont permis de préparer et de caractériser la NN' bis (hydroxymalonyl) éthylène diamine et la NN' bis (éthoxymalonyl) éthylène diamine, composés non encore signalés.

En série cyclique, nous avons effectué trois groupes de synthèses qui concernent :

- Les isomères α et β des acides aminocampholiques.

Pour leur préparation, nous avons repris et étudié les voies de synthèse des acide-nitriles correspondants. Pour leur transformation en acides aminés nous avons adopté un procédé de réduction catalytique avec le nickel de Raney. La conduite de l'opération, sans faire appel à une acidification, nous a permis d'isoler pour les deux isomères, les dihydrates qui n'avaient pas été décrits auparavant.

- L'acide (diméthyl-2, 2 α aminoéthyl-3) cyclobutane acétique.

Nous avons repris la synthèse du chlorhydrate et montré que l'on peut aussi préparer l'acide aminé directement par réduction catalytique.

- L'(hydroxycarbonyl-2 aminométhyl-2') diphényle.

Ce composé, non décrit, a été synthétisé à partir de l'acide-nitrile correspondant. Nous avons isolé l'acide aminé à l'état de chlorhydrate et d'hydrate.

De ces trois groupes de synthèses, nous pouvons retenir que pour préparer des acides aminés, une méthode de choix consiste à former d'abord le composé acide-nitrile correspondant, puis à effectuer sa réduction catalytique.

Contrairement à la plupart des méthodes décrites, nous avons pu, d'une façon générale, procéder sans acidification et obtenir directement l'acide aminé et non son chlorhydrate. Ce processus présente l'avantage d'éviter les difficultés d'une neutralisation ou de l'utilisation de résines échangeuses d'ions. Dans plusieurs cas, l'acide aminé a été obtenu sous forme d'hydrate.

METHODES D'APPRECIATION DE L'ACTIVITE ANTIFIBRINOLYTIQUE

- Pour rechercher l'éventuelle activité antifibrinolytique d'un composé, nous avons mis au point une méthode simple qui peut être mise en œuvre facilement ; elle présente l'avantage de pouvoir être utilisée rapidement chaque fois qu'un nouveau composé est synthétisé.

- Pour la détermination du pouvoir antifibrinolytique nous avons repris la méthode qui consiste à évaluer la lyse d'un caillot radioactif par

mesure de la radioactivité libérée ; nous avons simplifié le protocole expérimental au niveau du système activateur de la lyse.

NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA FIBRINOLYSE

- Sur le plan de la recherche du mécanisme de l'inhibition nous avons constaté que l'acide dl amino-2 pimélique et la glycyl β-alanine sont respectivement faiblement et moyennement doués de propriétés antifibrinolytiques. Ces résultats devraient vraisemblablement contribuer à une meilleure connaissance du phénomène de l'inhibition de la fibrinolyse.

- Sur le plan de la recherche de nouveaux antifibrinolytiques de synthèse nous avons montré en particulier que l'acide α aminocampholique et l'acide (diméthyl-2,2 α aminoéthyl-3) cyclobutane acétique possèdent un pouvoir inhibiteur comparable ou légèrement supérieur à celui de l'acide ε aminocaproïque qui est actuellement employé en thérapeutique.

Ces composés présentent l'originalité d'être des inhibiteurs de synthèse faciles à préparer à partir de composés d'origine naturelle. Par ailleurs ils sont dépourvus de toxicité. Pour ces raisons, l'hypothèse de leur emploi à titre de molécules médicamenteuses paraît pouvoir être retenue.

Les recherches que nous venons de résumer ont été effectuées en parallèle dans le domaine de la synthèse de composés organiques et dans celui de leurs essais biologiques orientés vers des fins thérapeutiques. Les résultats auxquels elles ont conduit incitent à poursuivre ce travail mais surtout permettent de conclure une fois de plus que si, pour la Chimie Thérapeutique il existe une source inépuisable de solutions originales, cette source est bien la Chimie Organique.

REFERENCES INSTRUMENTALES

Infrarouge

Les études infrarouge ont été effectuées à partir des spectres enregistrés sur un appareil PERKIN-ELMER 225. En cours de synthèse, les spectres de routine ont été enregistrés sur un appareil UNICAM SP 1000.

Pour étudier les acides aminés, insolubles dans les solvants organiques, on a préparé des dispersions dans le "Nujol" ou dans le "Fluorolube".

Résonance magnétique nucléaire

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre VARIAN A 60 fonctionnant sur 60 MHz.

L'étude des acides aminés, insolubles dans les solvants organiques, a conduit à employer des solutions dans l'eau lourde pour lesquelles le signal de référence à partir duquel on a mesuré les déplacements chimiques était celui du diméthyl-2,2 sila-2 pentane sulfonate-5 de sodium (DSS, $(CH_3)_3Si\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}SO_3^- Na^+$).

Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été enregistrés en basse résolution sur un appareil du type AEI MS 12 sous un courant de 70 électrons-volts avec un pouvoir de résolution de 2000.

Les masses ont été mesurées en haute résolution sur un appareil du type AEI MS 9 sous un courant de 70 électrons-volts avec un pouvoir de résolution de 12 000.

Dans les deux appareils les produits ont été introduits directement dans la source à une température de 180-200°.

Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire de certains acides aminés en solution dans l'eau a été calculé à partir de mesures de déviations effectuées à l'aide d'un polarimètre PERKIN-ELMER 141 fonctionnant avec une lumière de 589 nm de longueur d'onde.

Thermogravimétrie

La détermination de la quantité d'eau contenue par certains hydrates d'acides aminés a été effectuée à l'aide d'une thermobalance UGINE EYRAUD à enregistrement continu type B 60 avec programmation de température R.T. 64.

Hydrogénations catalytiques

L'autoclave, l'appareil à secousses, le système de régulation de la température, utilisés pour les hydrogénations catalytiques étaient du matériel PROLABO.

Mesures de radioactivités

Le comptage de la radioactivité a été effectué à l'aide d'un scintillateur solide à iodure de sodium à cristal creux, ABBOTT modèle 101.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les abréviations adoptées sont celles utilisées dans "World List of Scientific Periodicals", 3 vol., Butterworths, édit., London, 1963.

1 HUNTER J. - A treatise on the blood.

Nicol, London, 1794, 1 vol.

2 DENIS P.S. - Essai sur l'application de la chimie à l'étude physiologique du sang de l'homme et à l'étude physiopathologique, hygiénique et thérapeutique des maladies de cette humeur.

Béchet, Paris, 1838, 1 vol.

3 GREEN J.R. - Note on the action of sodium chloride in dissolving fibrin.

J. Physiol. Lond. 1887, 8, 372.

4 DASTRE A. - Fibrinolyse dans le sang.

Archs Physiol. Paris, 1893, 5, 661.

5 HEDIN S.G. - On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum on the ox.

J. Physiol., 1903, 30, 195.

6 MAC FARLANE R.G. - Fibrinolysis following operation.

Lancet, 1937, I, 10.

7 DELEZENNE C. & POKERSKI E. - Action du sérum sanguin sur la gelatine en présence du chloroforme.

C. r. Séanc. Soc. Biol., 1903, 55, 327.

8 OPIE E.L. & BARKER B.I. - Leucoprotease and antileucoprotease of mammals and birds.

J. exp. Med., 1907, 9, 207.

9 TILLET W.S. & GARNER R.L. - The fibrinolytic activity of haemolytic streptococci.

J. exp. Med., 1933, 58, 485.

10 CHRISTENSEN L.R. & MAC LEOD C.M. - A proteolytic enzyme of serum : characterisation, activation and reaction with inhibitors.

J. gen. Physiol., 1945, 28, 559.

11 ASTRUP T. - Fibrinolysis in the organism.

Blood, 1956, II, 781.

12 POLONOVSKI M. - Biochimie médicale, 3 vol., 8e édition.

Masson, édit., Paris, 1971.

13 SHULMAN S., ALKJAERSIG N. & SHERRY S. - Physicochemical studies on human plasminogen.

J. biol., Chem., 1958, 233, 91.

14 DAVIS M.C. & ENGLERT M.E. - Physical properties of highly purified human plasminogen.

J. biol. Chem., 1960, 235, 1011.

15 CHRISTENSEN L.R. & SMITH D.H. - Plasminogen purification by acid extraction.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1950, 74, 840.

16 ALKJAERSIG N., FLECHTER A.P. & SHERRY S. - Purification and properties of human plasminogen.

Biochem. J., 1958, 93, 171.

17 WALLEN P. & BERGSTROM K. - Effect of lysine on the purification of human plasminogen on cellulose ion exchanges.

Acta chem. scand., 1959, 13, 1464.

18 ABLONDI F.B. & HAGAN J.T. - Stability of the activator of bovine plasminogen.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1956, 93, 414.

19 SUMMARIAL L., HSIEH B. & ROBBINS K.C. - The specific mechanism of activation of human plasminogen to plasmin.

J. biol. Chem., 1967, 242, 4279.

20 ROBBINS K.C., SUMMARIA L., HSIEH B. & SHAH R.J. - The peptide chains of human plasmin.

J. biol. Chem., 1967, 242, 2333.

21 ALKJAERSIG N., FLECHTER A.P. & SHERRY S. - The activation of human plasminogen. II. A kinetic study of activation with trypsin, urokinase and streptokinase.

J. biol. Chem., 1958, 233, 86.

22 COLE E.R. & MERTZ E.T. - Studies on plasminogen. I. Further purification of bovine plasminogen.

Can. J. Biochem. Physiol., 1961, 39, 1419.

23 MARKUS G. & AMBRUS C.M. - Characterisation of enzymes resulting from plasminogen activation.

Fedn. Proc. Fedn. Ann. Socs. exp. Biol., 1959, 28, 98.

24 BELLER F.K. & GLAS P. - The activation of plasminogen by urokinase.

Thromb. Diath. haemorrh., 1961, 5, 531.

25 ALAGILLE D. & SOULIER J.P. - Action des enzymes protéolytiques sur le sang total "invitro". Modifications des facteurs de coagulation et du complément.

Sem. Hôp. Paris, 1956, 32, 355.

26 LEWIS J. H., HOWE A.G. & FERGUSON J.H. - Thrombin formation. II. The effect of lysin (fibrinolysin, plasmin) on prothrombin and tissue thromboplastin.

J. clin. Invest., 1949, 28, 1057.

27 MIRSKY I.A., PERISUTTI G. & DAVIS N.C. - Destruction of glucagon, adreno corticotrophin and somatotrophin by human blood plasma.

J. clin. Invest., 1959, 38, 14.

28 PILLEMER L., RATNOFF O.D., BLUM L. & LEPOW I.H. - The inactivation of complement and its components by plasmin.

J. exp. Med., 1952, 97, 573.

29 SAWYER W.D., FLETCHER A.P., ALKJAERSIG N. & SHERRY S. - Studies on the thrombolytic activity of human plasma.

J. clin. Invest., 1960, 39, 426.

30 KWAAN H.C., LO R. & MAC FADZEAN A.J.S. - On the production of plasma fibrinolytic activity within reins.

Clin. Sci., 1957, 16, 241.

31 ASTRUP T., ALBRECHTSEN O.K., CLASSEN M. & RASMUSSEN J. - Thromboplastic and fibrinolytic activity of the human aorta.

Circulation Res., 1959, 1, 969.

32 ALBRECHTSEN O.K. - The fibrinolytic agents in saline extracts of human tissues.

Scand. J. clin. Lab. Invest., 1958, 10, 91.

33 ASTRUP T. & STAGE A. - Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue.

Nature, Lond., 1952, 170, 929.

34 BARNETT E.V. & BARON S.L. - An activator of plasminogen produced by cell culture.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1959, 102, 308.

35 TODD A.S. - Localisation of fibrinolytic activity in tissues.

Brit. Med. Bull., 1964, 20, 210.

36 KUNZER W. & HABERHAUSEN A. - Fibrinolytic activity of human erythocytes.

Nature Lond., 1963, 198, 396.

37 SEMAR M., SKOZA L. & JOHNSON A.J. - Partial purification and properties of a plasminogen activator from human erythrocytes.

J. clin. Invest., 1969, 48, 1777.

38 GREIG H.B.W. & CORNELIUS E.M. - The proactivator activity of platelets.

S. Afr. J. med. Sci., 1961, 26, 101.

39 ASTRUP T. & STERDORFF I. - A fibrinolytic system in human milk.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1953, 84, 605.

40 MAC FARLANE R.G. & PILLING J. - Fibrinolytic activity of normal urine.

Nature Lond., 1947, 159, 779.

41 WILLIAMS J.R.B. - The fibrinolytic activity of urine.

Br. J. exp. Path., 1951, 32, 530.

42 SOBEL G.W., MOHLHER S.R., JONES N.W., DOWDY A.B. & GUEST M.M. - Urokinase : an activator of plasma profibrinolysin extracted from urine.

Am. J. Physiol., 1952, 171, 768.

43 BJERREHUUS I. - Fibrinolytic activity of the urine.

Scand. clin. Lab. Invest., 1952, 4, 179.

44 PLOUG J. & KJELDGAARD N.O. - Urokinase, an activator of plasminogen from human urine. I. Isolation and properties.

Biochem. Biophys. Acta, 1957, 24, 278.

45 LESUK A., TERMINIELLO L., TRAVER J.H. & GROFF J.L. Biochemical and biophysical studies of human urokinase.

Thromb. Diath. haemorrh., 1967, 18, 293.

46 LADEHOFF A.A. - The content of plasminogen in the human urinary tract.

Scand. J. clin. Labor. Invest., 1960, 12, 136.

47 ALI S.Y. & EVANS L. - Purification of rabbit kidney cytokinase and a comparison of its properties with human urokinase.

Biochem. J., 1968, 107, 293.

48 CELANDER D.M. & GUEST M.M. - The biochemistry and physiology of urokinase.

Am. J. Cardiol., 1960, 6, 409.

49 KUCINSKI C.S., FLETCHER A.P. & SHERRY S. - Effect of urokinase antiserum on plasminogen activators : demonstration of immunologic dissimilarity between plasma plasminogen activator and urokinase.

J. chin. Invest., 1968, 47, 1238.

50 MAC NICOL G.P., FLETCHER A.P., ALKJAERSIG N. & SHERRY S. - Impairment of hemostasis in the urinary tract : the role of urokinase.

J. Lab. clin. Med., 1961, 58, 34.

51 BLATT W.F., SEGAL H. & GRAY J.L. - Purification of streptokinase and human plasmin and their interaction.

Thromb. Diath. haemorrh., 1964, 11, 393.

52 CLIFTON E.E. & DOWNIE G.R. - Variations in proteolytic activity of serum of animals including man.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1950, 73, 559.

53 TROLL W. & SHERRY S. - The activation of human plasminogen by streptokinase.

J. biol. Chem., 1955, 213, 881.

54 ALKJAERSIG N., FLETCHER A.P. & SHERRY S. - The activation of human plasminogen. I. Spontaneous activation in glycérol.

J. biol. Chem., 1958, 233, 81.

55 KONTINEN Y. - Some observations on the effect of thrombin on the antifibrinolytic aspect of streptokinase.

56 MAC NICOL G.R. & DOUGLAS A.S. - The fibrinolytic enzyme system in Human Blood Coagulation, Haemostasis, Thrombosis, 4e édition, 1 vol., Biggs, Rosemary, Blackwell, édit., Oxford, 1972.

57 SOULIER J.P. & PROU-WARTELLE O. - Nouvelles données sur les facteurs Hageman et P.T.A. et sur le contact.

Revue fr. Et. clin. biol., 1959, 4, 932.

58 FEARLEY G.R. & CHAKRABARTI R. - Pharmacological enhencement of fibrinolytic activity of blood.

J. chin. Path., 1964, 17, 328.

59 SOULIER J.P. & KOUPERNIK C. - Constance de la fibrinolyse au cours du choc acétylcholinique.

Sang, 1948, 19, 362.

60 VON KAULA K.N. - On the mecanism of thrombolysis.

Thromb. Diath. haemorrh., 1961, 6 suppl. 1, 171.

61 GUEST M. - A study of antifibrinolysin activity in the plasmas of various animal species.

J. clin. Invest., 1948, 27, 785.

62 MAC NICOL G.P., GALE S. & DOUGLAS A.S. - In vitro and in vivo studies of a preparation of urokinase.

Br. med. J., 1963, 1, 909.

63 DAVER J., ALBUGUES M. J., QUERITET A. & MESSERLI P. - Le système inhibiteur de la fibrinolyse.

Revue méd. Toulouse, 1970, 6, 157.

64 KAWANO T., KATZUO M. & YASHIRO V. - Urokinase in human placenta.

Nature Lond., 1968, 217, 253.

65 DUBBER A.H.C., MAC NICOL G.P. & DOUGLAS A.S. - In vitro and in vivo studies with Trasylol, an anticoagulant and a fibrinolytic inhibitor.

Br. J. Haemat., 1968, 14, 31.

66 MILSTONE H. - A factor in normal human blood which participates in streptococcal fibrinolysis.

J. Immun., 1941, 42, 109.

67 MAC FARLANE R. & PILLING J. - Observations on fibrinolysis plasminogen, plasmin and antiplasmin content of human blood.

Lancet, 1946, II, 562.

68 JACOBSON K. - Electrophoretic demonstration of two trypsin inhibitors in human blood serum.

Scand. J. clin. Lab. Invest., 1953, 5, 97.

69 PECHET L. - Fibrinolysis
New Engl. J. Med., 1965, 273, 966.

70 SKRZYDLEWSKI Z., NIEWAROWSKI S. & SKRZYDLEWSKA - Inhibition of proteolytic enzymes by β lipoproteins.
J. Atheroscle. Res., 1966, 6, 273.

71 HOWELL M. - Effects of plasma lipids on fibrinolysis.
Br. med. Bull., 1964, 20, 200.

72 BRUCE S. - The effect of calcium on fibrinolysis in vitro.
J. clin. Path., 1964, 17, 282.

73 JOHNSON S.A. & SCHNEIDER C.L. - The existence of antifibrinolysis activity in platelets.
Science, 1953, 117, 229.

74 HOLEMANS R. & GROSS R. - Influence of blood platelets and fibrinolysis.
Thromb. Diath. haemorrh., 1961, 6, 196.

75 DUDOK DE WIT C. - Investigations on the inhibitions of the fibrinolytic system.
Thromb. Diath. haemorrh., 1964, 12, 105.

76 ALKJAERSIG N. & FLETCHER A.P. - The degradation of fibrinogen by plasmin.
Thromb. Diath. haemorrh., 1967, 18, 300.

77 SHERRY S., FLETCHER A.P. & ALKJAERSIG N. - Fibrinolysis and fibrinolytic activity in man.
Physiol. Rev., 1959, 39, 343.

78 ALKJAERSIG N., FLETCHER A.P. & SHERRY S. - The mecanism of clot dissolution by plasmin.
J. clin. Invest., 1959, 38, 1086.

79 ALKJAERSIG N., FLETCHER A.P. & SHERRY S. - Epsilon aminocoproïc acid : an inhibitor of plasminogen activation.
J. biol. Chem., 1959, 234, 832.

80 MAC NICOL G.P., BAIN W.H., WALKER F., RIFKIND B.M. & DOUGLAS A.S. - Thrombolysis studied in an artificial circulation.

Lancet, 1965, I, 838.

81 DALAL P.M., SHAH P.M., ALLINGTON M.J. & SHARP A.A. - Some observations on thrombolysis in vitro.

J. clin. Path., 1969, 22, 369.

82 BACK N., AMBRUS J.L., GOLDSTEINS & HARRISON J.W.E. - In vivo fibrinolytic activity and pharmacology of various plasmin preparations.

Circulation Res., 1956, 4, 440.

83 AMBRUS C.M. & MARKUS G. - Plasmin-antiplasmin complex as a reservoir of fibrinolytic enzyme.

Am. J. Physiol., 1960, 199, 491.

84 BACK N., AMBRUS J.L. & MINK I.B. - Distribution and fate of I^{131} labelled components of the fibrinolysis system.

Circulation Res., 1961, 9, 1208.

85 NOLF P. - Contribution à l'étude de la coagulation du sang. V. La fibrinolyse.

Archs int. Physiol., 1908, 6, 306.

86 GANROT P.O. & NILEHN J.E. - Competition between plasmin and thrombin for alpha-2 macroglobulin.

Clin. Chim. Acta, 1967, 17, 511.

87 SEEGERS W.H. - Thrombin as a fibrinolytic enzyme.

Science, 1960, 131, 726.

88 BELLER F.K. & GLAS P. - The activation of plasminogen by urokinase.

Thromb. Diath. haemorrh., 1961, 5, 531.

89 BIEZENSKI J.J. & MOORE H.C. - Fibrinolysis in normal pregnancy.

J. clin. Path., 1958, 11, 306.

90 BONNAR J., MAC NICOL C.P. & DOUGLAS A.S. - Coagulation and fibrinolytic mechanisms during and after normal childbirth.

Br. med. J., 1970, 2, 200.

91 MAC NICOL G.P., BARAKAT A.A. & DOUGLAS A.S. - Plasma fibrinolytic acitivity in renal disease.

Scott. med. J., 1965, 10, 189.

92 WARDLE E.N., MENON I.S. & RASTOGI S.P. - Study of proteines and fibrinolysis in patients with glomerulonephritis.

Br. med. J., 1970, 2, 260.

93 VASSILI P. & MAC CLUSKEY R.T. - The pathogenic role of fibrin deposition in immunologically induced glomerulonephritis.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 116, 1052.

94 ELLISSON R.C. & BROWN J. - Fibrinolysis in pulmonary vascular disease.

Lancet, 1965, I, 786.

95 PANDOLFI M., ISACSON S. & NILLSON I.N. - Low fibrinolytic activity in the walls of veins of patients with thrombosis.

Acta. med. scand., 1969, 186, 1.

96 HUME R. - Fibrinolysis in myocardial infarction.

Br. Heart J., 1958, 20, 15.

97 BENNET N.B., OGSTON C.M. & OGSTON D. - Studies onthe blood fibrinolytic enzyme system following acute myocardial infartion.

Clin. Sci., 1967, 32, 27.

98 HIRSCH J., FLETCHER A.P. & SHERRY S. - Effect of fibrin and fibrinogen proteolysis products on clot physical properties.

Ann. J. Physiol., 1965, 209, 415.

99 MAC NICOL G.P., BROWNE M.K., BAYLEY C. & DOUGLAS A.S. - Pathological fibrinolytic states and their treatment with epsilon aminocaproic acid.

Br. J. Surg., 1966, 53, 26.

100 DOUGLAS A.S., MAC NICOL G.P., BAIN W.H. & MACKEY W.A. - The hemostatic defect following extracorporeal circulation.

Br. J. Surg., 1966, 53, 455.

101 NILSSON I.M. & RYBO G. - Treatment of menorrhagia with an antifibrinolytic agent, tranexamic acid.

Acta obstet. gynec. scand., 1967, 46, 572.

102 HARMS W. - Uber die Behandlung geburtshilflicher und gynäkologischer Blutengen mit einem neuen Antifibrinolytikum.

Medsche Welt Stutt., 1968, 19, 643.

103 TAGNON H.J., WHITMORE W.F. & SCHULMAN N.R. - Fibrinolysis in metastatic carcinoma of the prostate.

Lancet, 1952, II, 9.

104 RATNOFF O.D. - Studies on a proteolytic enzyme in human plasma.

J. clin. Invest., 1952, 31, 521.

105 FLETCHER A.P., BIEDERMAN O., MOORE D., ALKJAERSIG N. & SHERRY S. - Abnormal plasminogen - plasminsystem activity (fibrinolysis) in patients with hepatic cirrhosis.

J. clin. Invest., 1964, 43, 681.

106 LABORATOIRES HOECHST - Streptase.

Centre de documentation HOECHST, 1970.

107 OKAMOTO S., OSHIBA H., MIHARA H. & OKAMOTO U. - Synthétic inhibition of fibrinolysis. In vitro and in vivo mode of action.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1968, 146, 414.

108 OKAMOTO S. - British Patent 770 693 (1957)
U.S. Patent 29 39 817 (1960)

109 SJOEDSMA A. & NILSSON I.M. - Aliphatic aminocompounds as inhibitors of plasminogen activation.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1960, 103, 533.

110 LOHMANN K., MARKWARDT F. & LANDMANN H. - Zusammenhänge zwischen Konstitution und Wirkung bei Hemmstoffen der Fibrinolyse.

Thromb. Diath. haemorrh., 1964, 10, 424.

111 MARKWARDT F. & RICHTER M. - Uber die antifibrinolytische Wirkung von Derivaten der p Aminomethylbenzoesäure (PAMBA).

Acta biol. med. germ., 1964, 13, 719.

112 MURAMATU M., ONISHI T., MAKINO S., FUJII S. & YAMAMURA Y. - Inhibition of fibrinolytic activity of plasmin by various synthetic inhibitors.

J. Biochem. Tokyo, 1965, 57, 450.

113 BERTELLI A. & PRINO G. - Antifibrinolytic activity of some epsilon aminocaproic acid derivatives.

Atti. Accad. med. lomb., 1966, 21, 4.
Chem. Abstr., 69, 1524 k.

114 GRAVILOV A.P. - Inhibitors of fibrinolysis.

Farmak. Toks., 1967, 30, 460.
Chem. Abstr., 67, 80951 g.

115 DOLESCHEL W. & AVERSWALD W. - Vergleichende Untersuchungen über di Hemmwirkung von caprolactam und analogen Verbindungen auf Kinine und Faktoren des fibrinolytischen Systems.

Wien. Med. Wschr., 1967, 117, 137.

116 AUERSWALD & DOLESCHEL W. - Lactones as inhibitors of the fibrinolytic system.

Science, 1967, 156, 1244.

117 GRAVILOV A.P., TISHCHENKO Z.V. & LAKIN K.M. - Experimental and clinical study of fibrinolysis inhibitors.

Nekot. Aktual. Vop. Biol. Med., 1968, 16
Chem. Abstr., 73, 119012 C.

118 CHAPLYGINA Z.A. & LERNER J.M. - Antifibrinolytic effect of some synthetic amino acids.

Sb. Tr. Leningrad. Nauch. - Issled. Inst. Gematol. Pereliv. Krovi, 1967, 15, 100.
Chem. Abstr. 69, 58216 r.

119 NAGAMATSU A., OKUMA T., WATANABE M. & YAMAMURA Y. - The inhibition of plasmin by some aminoacid derivatives.

J. Biochem. Tokyo, 1963, 54, 491.

120 NAGAMATSU A., OKUMA T., HAYASHIDA T. & YAMAMURA Y. - Studies on antiplasminic agents.

Chem. Pharm. Bull. Tokyo, 1965, 16, 211.

121 SKOZA L., TSE A.O., SEMAR M. & JOHNSON A.J. - Comparative activities of amino acid and polypeptide inhibitors on natural and synthetic substrats.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 1968, 146, 659.

122 FUJII A., TANAKA K. & COOK E.S. - Antistaphylococcal and antifibrinolytic activities of N^{α} (ω Aminoacyl) L lysines.

J. med. Chem., 1972, 15, 378.

123 MARKWARD F., NEULAND P. & KLOCKING H.P. - Uber die antifibrinolytische Wirkung von Estern der 4 Aminomethyl benzoesaüre (PAMBA).

Pharmazie, 1966, 21, 345.

124 JOHSON A.J., SKOZA L. & TSE A.O. - Studies on plasmin inhibition and plasminogen activation and its inhibition.

Thromb. Diath. haemorrh., 1969, 32 suppl., 105.

125 MARKWARDT F. & HAUSTEIN K.O. - Die pharmakologische charakterisierung des neuen antifibrinolytckums p. aminomethyl benzoesaüre.

Arch. int. Pharmacodyn. Ther., 1964, 152, 223.

126 MANGYO M. - Antifibrinolytic activities of ω aminoacids and related compounds.

J. Biochem. Tokyo, 1964, 36, 735.

127 RICHTER M. & MARKWARD F. - Combination effect of PAMBA and contrykal.

Folia Haemat. Lpz, 1969, 92, 90.

128 MAKI M. & KATSUJI S. - Pathophysiology of plasmin system.

Tohoku J. exp. Med., 1972, 106, 233.
Chem. Abstr., 77, 43825 c.

129 OKAMOTO S. & OKAMOTO U. - Aminomethyl cyclohexane carboxylic acid. A new potent inhibitor of the fibrinolysis.

Keio J. Med., 1962, 11, 105.

130 LOHMANN K., MARKWARDT F. & LANDMANN H. - Uber neue Hemmstoffle der Fibrinolyse.

Naturwissens chaften, 1963, 50, 502.

131 OKAMOTO S., SATO S., TAKADA Y. & OKAMOTO U. - An active stereoisomer (trans form) of AMCHA and its antifibrinolytic (antiplasminic) action in vitro and in vivo.

Keio J. Med., 1964, 13, 177.

132 BAUMGARTEN W., PRIESTER L.I., STILLER D.W., DUNCAN A.E.W., CIMINERA J.L. & LOEFFLER L.J. - 4 Aminomethyl bicyclo (2, 2, 2) octane 1 carboxylic acid a new potent antifibrinolytic agent.

Thromb. Diath. haemorrh., 1969, 22, 263.

133 LOEFFLER L.J., BRITCHER S.F. & BAUMGARTEN W. - Bridged bicyclic and polycyclic aminoacids. Potent new inhibitors of the fibrinolytic process.

J. med. Chem., 1970, 13, 926.

134 BAUMGARTEN W. - Synthetic antifibrinolytic agents.

in AMBRUS J.L. - Hematologic Reviews, vol. 3, M. Dekker, édit., New York, 1972.

135 KAWANO S., KOMAKI T. & WATANABE H. - 4 Aminomethyldecalin - 1 - carboxylic acid.

Brevet japonais 7038325 (1970) - Chem. Abstr. 74, 87505 t.
Brevet allemand 2058297 (1970) - Chem. Abstr. 77, 88158 f.

136 EISAI COMPANY - Pharmacologically active 4 aminomethyl decalin -1- carboxylic acid.

Brevet français 2115096 (1970) - Chem. Abstr. 78, 124349 a.

137 LANDMANN - Synthetische Hemmstoffe des Plasmins.

Haematologia, 1970, suppl. 1, 169.

138 MARKWARDT F., KLOKING H.P. & NOWAK G. - Antithrombin und antiplasminwirkung von 4 amidinophenyl brenztraubensäure (APPA) in vivo.

Thromb. Diath. haemorrh., 1970, 24, 240.

139 GERATZ J.D. - p. Amidinophenylpyruvic acid : a new highly effective inhibitor of enterokinase and trypsin.

Arch. Biochem., 1967, 118, 90.

140 GERATZ J.D. - Inhibition of thrombin, plasmin and plasminogen activation by amidino compounds.

Thromb. Diath. haemorrh., 1970, 23, 486.

141 GERATZ J.D. - Inhibition of coagulation and fibrinolysis by aromatic amidino compounds.

Thromb. Diath. haemorrh., 1971, 25, 391.

142 DUBBER A.H., MAC NICOL G.P. & DOUGLAS A.S. - Aminomethyl-cyclohexane carboxylic acid (AMCHA), a new synthetic fibrinolytic inhibitor.

Br. J. Haemat., 1965, 11, 237.

143 ABLONDI F.B., HAGAN J.J., PHILIPS M. & DE RENZO E.C. - Inhibitor of plasmin, trypsin and the streptokinase activated fibrinolytic system by epsilon aminocaproïc acid.

Archs Biochem. Biophys., 1959, 82, 153.

144 MIHARA H. - Action of the new antifibrinolytic substance on the streptokinase activated proteases.

Kobe J. med. Sci., 1963, 9, 169.

145 AMBRUS C.M., AMBRUS J.L., LASSMAN H.B. & MINK I.B. - Studies on the mecanism of action of inhibitors of the fibrinolysin system.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1968, 146, 430.

146 LUKASIEWICZ H. & NIEWAROWSKI S. - In vitro studies on the mecanism of the antifibrinolytic action of EACA.

Thromb. Diath. haemorrh., 1968, 19, 584.

147 ABIKO Y. - Plasminogen - plasmin system. V - A stœchiometric equilibrium complex of plasminogen and synthetic fibrinolytic inhibitor.

Biochem. Biophys. Acta, 1969, 185, 424.

148 IWAMOTO M. & ABIKO Y. - Further kinetic studies on the inhibition of fibrinolysis by synthetic inhibitors.

J. Biochem. Tokyo, 1969, 65, 821.

149 MAXWELL R., NAWROCKI J.W. & NICKEL V.S. - Some complexities of multiple inhibitor interactions in fibrinolytic system.

Thromb. Diath. haemorrh., 1968, 19, 117.

150 TOMUS L., SUCIU A., ROSENFELD E. & CORDOS D. - Effect of sodium aspartate on the activity of some proteases and lipid components in the dog.

Fiziologia norm. patol., 1972, 18, 133.
Chem. Abstr. 77, 96945 a.

151 LINSTEAD R.P. & WANG B.L. - The coupling of diazonium salts with derivatives of cyclic β ketonic acids.

J. chem. Soc., 1937, 807.

152 WADE R., BIRNBAUM S.M., WINITZ M., KOEGEL R.J. & GREENSTEIN J.P. - Preparation and propertics of the isomeric forms of α-amino and α,ε -diaminopimelic acid.

J. Am. chem. Soc., 1957, 79, 648.

153 VOGEL A.I. - Physical properties and chemical constitution. Esters of normal dibasic acids and of substituted malonic acids.

J. chem. Soc., 1934, 333.

154 DIECKMANN W. - Uber cyklische β ketoncarbonsäure ester.

Justus Leibigs Annln Chem., 1901, 317, 27.

155 DOBSON M.E., FERNS J. & PERKIN W.H. - Synthesis of cyclo-hexanone-3 carboxylic acid.

J. chem. Soc., 1909, 95, 2010.

156 MANSKE R.H. & ROBINSON R. - The decomposition of β -3-indolyl propionic Azide.

J. chem. Soc., 1927, 240.

157 JACKSON R.W. & MANSKE R.H. - The synthesis of indolyl-butyric and some of its derivatives.

J. Am. chem. Soc., 1930, 52, 5029.

158 TEICHMANN B. - Reactions with brominated dicarboxylic acids. I. Preparation of aliphatic α bromodicarboxylic acid esters.

Acta chim. Acad. sci. Hung., 1964, 41, 331.
Chem. Abstr., 1965, 62, 2704 c.

159 AUGUSTIN M. - Synthese Höherer dl α aminodicarbonsäuren.

Acta chim. Acad. Sci. Hung., 1965, 46, 85.

160 HILL A.J. & ASPINALL S.R. - The preparation and cyclization of monoacylethylenediamines.

J. Am. chem. Soc., 1939, 61, 822.

161 ZIENTY F.B. - Cyclic thioureas.

J. Am. chem. Soc., 1946, 68, 1388.

162 MARGUERY F. - Sur quelques dérivés dissymétriques de la série malonique.

Bull. Soc. chim. Fr., 1905, 33, 541.

163 STRUBE R.E. - Ethyl t. butylmalonate.

in RABJOHN N., Organic Syntheses, collective vol. IV, 417. J. Wiley, édit., New York, 1967.

164 QUELET R. & MILCENT R. - Dérivés du monohydrazide de l'acide malonique.

Annls Chim. 1967, 2, 159.

165 ODDO & LEONARDI -
Gazz. chim. ital. 1896, 26, 409.

166 HALLER A. & MINGUIN M. - Sur le mononitrile camphorique.

C. r. hebd. séanc. Acad. Sci. Paris 1896, 123, 216.

167 HOOGEWERFF S. & VAN DORP W.A. - Sur quelques dérivés de l'acide camphorique et de l'acide hemipinique.

Rec. Trav. chim. Pays-Bas Belg., 1895, 14, 252.

168 RUPE H. & SPLITTGERBER I. - Zur Kenntnis der beiden aminocampholsäuren.

Ber. dt. chem. Ges., 1907, 40, 4311.

169 NOYES W.A. & TAVEAU -
Am. chem. J., 1910, 32, 287.

170 NOYES W.A. & POTTER R.S. - The valence of nitrogen in ammonium salts.
J. Am. chem. Soc., 1915, 37, 189.

171 SALMON-LEGAGNEUR F. - Contribution à l'étude des mononitriles de l'acide camphorique.
Annls Chim., 1927, 7, 385 et 1927, 8, 5.

172 TAFEL J. & ECKSTEIN K. - Elektrolytische reduction von camphersäure imid.
Ber. dt. chem. Ges., 1901, 34, 3274.

173 ALBERT A. & MAGRATH D. - Benzylamine 4 carboxylic acid.
J. chem. Soc., 1944, 678.

174 LEVINE M. & SEDLECKY R. - Preparation of p. and m. aminoéthyl-cyclohexyl carboxylic acid.
J. org. Chem., 1959, 24, 115.

175 MELANDER B.O., HANSHOFF G., GRANSTRAND B. & OLSSON B.M. - Antifibrinollytically-active isomer t. AMCHA.
Brevet U.S. 3574721 (1964).
Chem. Abstr., 1971, 75, 19782 b.

176 MOZINGO R. - Catalyst, Raney Nickel, W2.
in HORNING E.C. - Organic syntheses, collective vol. III, 181 - J. Wiley, édit., New York, 1955.

177 CLAISEN L. & MANASSE O. - Uber isonitrosocampher und dessen umvandlungsprodukte.
Justus Leibigs Annln Chem., 1893, 274, 71.

178 BREDT - Uber camphozean - aldehydsäure.
J. prakt. Chem., 1917, 95, 65.

179 SALMON-LEGAGNEUR F. - Homologues supérieurs de l'acide camphorique et du β homocamphre.
Bull. Soc. Chim. Fr., 1932, 51, 807.

180 FORSTER M.O. - Studies in the camphane series. XIV isonotroso-camphor.
J. chem. Soc., 1904, 85, 892.

181 FORSTER M.O. - Studies in the camphane series. XXXIV. Configuration of the eight oximino-derivatives of camphorquinone.

J. Chem. Soc., 1913, 103, 662.

182 BEILSTEIN - Ethylène diamine di HCl.

Beilsteins Hand buch der organischen chemie, 4. III, 483.

183 MEISENHEIMER J. & THEILACKER W. - Uber die konfiguration der Campherchinon-oxime.

Annln Chem., 1932, 493, 33.

184 HALLER A. - Sur la campholide, produit de réduction de l'anhydride camphonique.

C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 1896, 122, 293.

185 BAEYER A. & VILLIGER V. - Einwirkung des Caro'schen reagens auf ketone.

Ber. dt. chem. Ges., 1899, 32, 3625.

186 SAVERS R.R. - Oxidation of camphor with peracetic acid.

J. Am. chem. Soc., 1959, 81, 925.

187 HALLER A. - Sur la transformation de l'acide camphorique droit en camphre droit ; synthèse partielle du camphre.

C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 1896, 122, 446.

188 ORVOS L. & NOSKO L. - Pyrolytic decarboxylation of ^{14}C carboxylic acids.

Tetrahedron Letters, 1960, 2, 19.

189 BISHOP A.W., CLAISEN L. & SINCLAIR - Uber den oxymethylen-campher.

Justus Leibigs Annln Chem., 1894, 281, 314.

190 MINGUIN M. - Etude de quelques dérivés du camphre cyané et de l'éther camphocarbonique.

Annls Chim., 1894, 2, 385.

191 PALFRAY L. - Contribution à l'étude des produits de réduction de quelques acides dérivés du camphre.

Annls Chim., 1923, 20, 297.

192 DELEPINE M. - Sur la préparations et les propriétés de l'acide pinomique.

Bull. Soc. chim. Fr., 1936, 1369.

193 GALLAS G. & MONTAÑES J.M. - Derivados del pineno.

An. Soc. esp. Fís . Quím., 1930, 28, 1163.

194 HARISPE M. & PERNIN J. - Hydrogénation d'oximes de la série cyclobutanique. I . Acides pinoniques et leurs oximes.

Bull. Soc. chim. Fr., 1950, 660.

195 AVOTINS F. & KARKLINA A. - (±) cis - 2,2 dimethyl-3 (∝ aminoethyl) cyclobutane-acetic acid.

Brevet U.R.S.S. 216691 (1968).
Chem. Abstr., 69, 96051 r.

196 AVOTINS F., KARLINA A. & GUDRINIECE E. - Pinonic acid. VII Catalytic réduction of dl-cis- pinonic acid oxime on Lubarskii Raney-type catalysts.

Latv. PSR Zinat. Abad. Vestis. Kim. Ser., 1968, 5, 578.
Chem. Abstr., 70, 37248 h.

197 POPLAVSKAYA I.A. - Synthesis of cholesterol 2,2 - dimethyl-3 (∝ aminoethyl) cyclobutyl acetic acid ester.
Zh. Obshch. Khim., 1968, 38, 2677
Chem. Abstr., 70, 88062 a.

198 AVOTINS F., BIZDENA E. & GUDRINIECE E. - Pinonic acid. VIII Hydramination of dl cis pinonic acid by the Leikart method.

Latv. PRR Zinat. Akad. Vestis. Kim. Ser., 1969, 4, 484.
Chem. Abstr., 72, 78491 s.

199 LE VAN THOI - Contribution à l'étude de l'acide pinonique et de ses dérivés.

Annls Chim., 1955, 10, 35.

200 GRAEBE C. & AUBIN C. - Uber diphensäureanhydrid und uber o-diphenylenketoncarbonsäure.

Justus Leibigs Annln. Chem., 1888, 247, 257.

201 UNDERWOOD H.W. & KOCHMANN E.L. - Studies in the diphenic acid series. II.

J. Am. Chem. Soc., 1924, 46, 2069.

202 UNDERWOOD H.W. & CLOUGH L.A. - Studies in the diphenic acid series III.

J. Am. Chem. Soc., 1928, 51, 583.

203 BELL F. - Preparation of diethylaminoethanol esters of diphenyl 2 carboxylic acid and derivatives.

J. Chem. Soc., 1928, 3248.

204 GOLDSCHMIDT H. - Uber die einwirkung von hydroxylamin auf diketone.

Ber. dt. chem. Ges., 1883, 16, 2176.

205 PSCHORR R. - Uber das 9 amino-10 oxyphenanthren und 9.10 diamino phenanthren.

Ber. dt. chem. Ges., 1902, 35, 2729.

206 WERNER A. & PIGUET A. - Beckmannische umlagerung durch benzolsulfonsäurechlorid bei gegenwart von alkali oder pyridin.

Ber. dt. chem. Ges., 1904, 37, 4295.

207 RAPOPORT H. & WILLIAMS A.R. - A synthesis of dibenzocycloheptadiene.

J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 1774.

208 HAWTHORNE J.O. & MIHELIC E.L. - 6, 7 Dihydro-5 H-dibenz-(c-e) azepin-7-ones used to inhibit or reverse the physiological effect of epinephrine.

Brevet U.S. 3551414 (1970).
Chem. Abstr., 74, 125484 v.

209 MARKWARDT F., LANDMANN H. & KLOCKING H.P. - Fibrinolytika und Antifibrinolytika.

Gustav Fischer Verlag, Jena, 1972, 1 vol.

210 RATNOFF L.P., LEPOW I.H. & PILLIMER L. - The multiplicity of plasmin inhibitors in human serum, demonstrated by the effect of primary amino coumpounds.

Bull. Johns Hopkins Hosp., 1954, 94, 169.

211 DAUSSET J., BERGEROT & BLONDEL Y. - Acceleration of fibrinolysis of blood-clots by dilution with salive and human serum.

Lancet, 1956, II, 123.

212 FEARNLEY G.R., BALMFORTH G. & FEARLEY E. - Evidence of a diurnal fibrinolytic rythme ; with a simple method of measuring natural fibrinolysis.

Clin. Sci., 1957, 16, 645.

213 SCHULTZ R.L. et col. - Evaluation of synthetic substrate methods for clinical determination of fibrinolysis.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1957, 94, 198.

214 VON KAULLA K. & SCHULTZ R. - Methods for the evaluation of human fibrinolysis.

Amer. J. Clin. Path., 1958, 29, 104.

215 NIEWIAROWSKI S., STUART R.K. & DUNKAN P.T. - Activation of intravascular coagulation by collagen.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1966, 123, 196.

216 FLUTE P.T. - Exploration clinique de la fibrinolyse.

Concours Méd., 1964, 86, 2541.

217 BLIX S. - The quantitative determination of fibrinolytic inhibitors in plasma or serum by means of the fibrin plate.

Scand. J. clin. Lab. Invest., 1964, 16, 403.

218 LACKNER H. & GOOSEN C.C. - Fibrinolytic activity of blood : photographic determination of clot lysis time.

Acta Haemat., 1959, 22, 58.

219 CHAKRABARTI R. & FEARNLEY G.R. - The fibrinolytic potential as a simple measure of spontaneous fibrinolysis.

J. clin. Path., 1962, 15, 228.

220 CASH J.D. & LEASK E. - Multichannel system for the automatic recording of clot lysis.

J. clin. Path., 1967, 20, 209.

221 BERG W., KORSAN-BENGTSEN K. & YGGE J. - Plasminogen essay by means of the lysis time method.

Thromb. Diath. haemorrh., 1965, 14, 127.

222 GALLIMORE M.J. & SHAW J.T.B. - Some aspects of fibrin clot lysis and its inhibition by human serum.

Thromb. Diath. haemorrh., 1967, 18, 101.

223 LINIGER W. & RUEGSEGGER P. - Fibrinolysis : mathematical and experimental studies.

Thromb. Diath. haemorrh., 1967, 17, 412.

224 MERRILLS R.J. & SHAW J.T.B. - Kinetics of fibrin clot lysis.

Biochem. J., 1968, 106, 101.

225 MULLERTZ S. - Formation and properties of the activation of plasminogen and of human and bovine plasma.

Biochem. J., 1965, 61, 424.

226 MARKUS G. & AMBRUS C.M. - On the formation of different types of plasmin by streptokinase activation.

J. biol. Chem., 1960, 235, 1673.

227 REMMERT L.P. & COHEN P.P. - Partial purification and properties of a proteolytic enzyme of human serum.

J. biol. Chem., 1949, 181, 431.

228 TROLL W., SHERRY S. & WACHMAN J. - The action of plasmin on synthetic substrates.

J. biol. Chem., 1954, 208, 85.

229 HAWKEY C.M. & STAFFORD J.L. - A standard clot method for assay of plasminogen activators, anti-activators and plasmin.

J. clin. Path., 1964, 17, 175.

230 CORRELL J.H. & SJOERDSMA A. - Inhibition of a human fibrinolysis system by normal and pathologic sera.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1962, 111, 274.

231 MANN R.D. - Method of estimating the inhibitory affect of plasma or serum upon urokinase activated fibrinolysis.

J. clin. Path., 1966, 19, 233.

232 ALBRECHTSEN O.K. - The fibrinolytic activity of human tissues.

Brit. J. Haemat., 1957, 3, 284.

233 SHERRY S. & ALKJAERSIG N. - Studies on fibrinolytic enzyme of human plasma.

Thromb. Diath. haemorrh., 1957, 1, 264.

234 JACOBSSON K. - Studies on the detrmination of fibrinogen in human blood plasma. Studies on the trypsin and plasmin inhibitors in human blood serum.

Scand. J. clin. Lab. Invest., 1955, suppl., 103.

235 HOWELL M. - A method for the comparison of the antiplasmin activity of two groups of blood sera.

J. clin. Path., 1963, 16, 289.

236 DAVER J., ALBUGUES M.J., DU PASQUIER J.P. & RICOEUR M. - Dosage des inhibiteurs sériques de la fibrinolyse par la méthode des "standard-clots".

Path. Biol., 1970, 18, 687.

237 ASTRUP T. & MULLERTZ S. - The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity.

Archs Biochem., 1952, 40, 346.

238 GORMSEN J. - Fibrinolytic activity. Inhibition of plasminogen activation.

Acta Med. Scand., 1962, 172, 657.

239 BAUMGARTEN W., CIMINERA J.L. & COLLE R.B. - Assay procedure for the quantitative determination of clot lysis activity.

Vox Sang., 1962, 51, 314.

240 CHRISTENSEN L.R. - Methods for measuring the activity of components of the streptococcal fibrinolytic system and streptococcal desoxyribonuclease.

J. clin. Invest., 1949, 28, 163.

241 DAVER J., ALBUGUES M.J., DU PASQUIER J.P. & RICOEUR M. - Dosage des inhibiteurs sériques de la fibrinolyse par la méthode des plateaux de fibrine.

Annls Biol. clin., 1969, 27, 721.

242 SHULMAN N.R. & TAGNON H.J. - Proteolytic activity determined with a substrate tagged with radioactive iodine.

J. biol. Chem., 1950, 186, 69.

243 CLEMENT W.E. & MAC NICOL G.P. - The preparation and use of I^{131}-tagged fibrinogen to demonstrate fibrinolysis.

J. clin. Path., 1959, 12, 544.

244 DUDOK DE WIT, KRIJNEN H.W. & DEN OTTOLANDER G.J.H. - The measurement of fibrinolytic activity with I^{131}-labelled clots . I . The methods.

Thromb. Diath. haemorrh., 1962, 8, 315.

245 BALL A.P. & DAY E.D. - Urokinase-induced fibrinolysis of I^{125}-fibrin.

Thromb. Diath. haemorrh., 1970, 24, 463.

246 DEUTSCH E. & FISCHER M. - Comparative studies on inhibitors of fibrinolysis in vitro and in vivo.

Acta haemat., 1968, 39, 1.

247 LUSCHER E.F. & KASER-GLANZMANN R. - A new method for the quantitative determination of fibrinolytic activities, based on the use of fluorescent fibrin as a substrate.

Vox Sang., 1961, 6, 116.

248 BLOMBÄCK B. & BLOMBÄCK M. - Purification of human and bovine fibrinogen.

Ark. Kemi., 1956, 10, 415.

249 CHADWICK C.S., MAC ENTEGART M.G. & NAIRN R.C. - Fluorescent protein tracers.

Immunology, 1958, 1, 315.

250 KOHN J. - A simple method for the concentration of fluids containing proteins.

Nature, Lond., 1959, 39, 343.

251 EGEBLAD K. - Inhibitors of fibrinolysis. A comparative thromboelastographic study.

Scand. J. clin. Lab. Invest., 1967, 20 suppl., 69.

252 EGEBLAD K. - Effects of ε aminocaproïc acid on fibrin clot lysis.

Thromb. Diath. haemorrh., 1966, 15, 173.

TABLE DES MATIERES

Introduction 3

Première partie : La fibrinolyse et son inhibition par des inhibiteurs de synthèse. 5

I - Les éléments du système plasminogène-plasmine 11
II - Le mécanisme de l'activation du plasminogène 19
III - Le rôle biologique de la fibrinolyse 21
IV - Correction par la thérapeutique des variations pathologiques 25

Deuxième partie : Les inhibiteurs synthétiques de la fibrinolyse. Synthèse de quelques ε aminoacides susceptibles de présenter une activité antifibrinolytique. 27

Chapitre I : Les inhibiteurs synthétiques de la fibrinolyse 29

I - Dérivés linéaires du type AEAC 32
II - Dérivés de la lysine 36
III - Dérivés cycliques des types PAMBA et AMCHA 37
IV - Dérivés bicyliques 40
V - Inhibiteurs possédant un groupement amidine 42
VI - Conclusion 43

A. Mécanisme d'action des antifibrinolytiques de synthèse 43

B. Projet d'investigations ayant pour but la découverte de nouveaux composés doués de propriétés antifibrinolytiques 44

Chapitre II : Synthèse de l'acide dl amino-2 pimélique 57

Partie expérimentale 61

Chapitre III : Essai de synthèse de la N (hydroxymalonyl) éthylène diamine 63

Partie expérimentale 69

Chapitre IV : Synthèses des acides aminocampholiques 73

I - Synthèse par l'intermédiaire des acides camphoramiques 77
II - Synthèse par l'intermédiaire de l'isonitrosocamphre 87
III - Etude de la préparation de l'acide triméthyl-1, 2, 2 aminoéthyl-3 cyclopentane carboxylique 89

Partie expérimentale 91

Bordeaux, 6 septembre 1974.

VU, Bon à imprimer,
Le Président de Thèse,
P. MESNARD

VU,
Le Président de l'
Université BORDEAUX II,
H. BRICAUD

VU et permis d'imprimer,
Le Chancelier des Universités,
R. PAULIAN